

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'ACTION NEUROAGRÉGATIVE DE LA CÉRULOPLASMINÉ
IMPLIQUERAIT UNE ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
PHILIPPE DUCHARME

JUILLET 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais grandement remercier ma directrice de recherche, Dre Joanne Paquin, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et permis d'entreprendre des études de maîtrise en recherche. Je lui suis également très reconnaissant pour son encadrement ainsi que pour son dévouement à la recherche. Je tiens également à remercier le Dr Mircea-Alexandru Mateescu pour sa précieuse collaboration au projet, particulièrement pour son expertise sur les protéines à cuivre et les matrices chromatographiques.

Je voudrais remercier M. Michel Marion (assistant de recherche) pour son soutien technique.

Je remercie M. Alain Viau qui a généreusement donné de son temps pour m'accompagner à l'abattoir de bœuf pour y récupérer du matériel biologique. Sans oublier les cafés partagés au petit café du coin!

Je ne peux passer sous silence l'aide de mes collègues étudiants que je côtoie quotidiennement dans le laboratoire, d'abord Frédéric Bouchard avec qui j'ai plaisir à échanger idées et conseils relativement au projet, ainsi que Josianne Gagné, particulièrement pour sa participation au projet. Un gros merci à ces deux personnes que j'apprécie et qui mettent de la bonne humeur et de l'humour au travail.

Un merci tout spécial à mes parents, qui m'encouragent à persévérer dans ce que j'entreprends, et bien sûr à Annie, ma fiancée, qui constamment est là pour me soutenir.

Je remercie le centre de recherche Biomed de l'UQAM pour la bourse d'études, de même que pour le prix qui m'a été octroyé lors du colloque annuel Biomed 2006. Je tiens également à remercier la Faculté des sciences de l'UQAM pour l'aide financière apportée dans le cadre de la participation à la 48^e Réunion annuelle du Club de Recherche Cliniques du Québec (septembre 2006).

Enfin, je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) pour la subvention accordée à ce projet de recherche.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ.....	xii
 CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	 1
1.1 Découverte de la céruloplasmine (CP)	1
1.2 Caractéristiques structurales de la CP	2
1.3 Biosynthèse et expression de la CP	6
1.4 Principaux rôles associés à la CP	9
1.4.1 Activité catalytique de la CP	9
1.4.2 Régulateur des amines biogènes.....	10
1.4.3 Transport du cuivre	10
1.4.4 Propriétés antioxydantes	12
1.4.5 Protéine de phase aiguë	14
1.4.6 Rôle dans l'angiogenèse.....	14
1.4.7 Régulateur du métabolisme du fer.....	15
1.4.8 Autres actions de la CP	19
1.5 Protéines de liaison de la CP	20
1.6 Développement du cerveau et neuromigration	25
1.6.1 Description phénoménologique de la neuromigration.....	25
1.6.2 Quelques modulateurs de la neuromigration	28
1.7 Le modèle de carcinome embryonnaire murin P19.....	32
1.7.1 Origine et différenciation neuronale.....	32
1.7.2 Action neuroagréative de la CP.....	36
1.8 Hypothèse de recherche et objectifs	38
 CHAPITRE II: MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	 39
2.1 Purification et dosage de la CP.....	39
2.1.1 Purification de la CP à partir de sérum bovin.....	39
2.1.2 Dosage de l'activité oxydasique de la CP	40
2.2 Chromatographie d'extraits biologiques sur CP immobilisée	40

2.2.1 Immobilisation de la CP sur gel d'agarose	40
2.2.2 Préparation d'extraits de protéines membranaires d'érythrocytes	41
2.2.3 Préparation d'extraits de protéines totales de cerveau	42
2.2.4 Chromatographie d'extraits de protéines sur CP-agarose	42
2.3 Différenciation neuronale et traitements des cellules P19	43
2.3.1 Culture des cellules P19 indifférenciées	43
2.3.2 Différenciation neuronale des cellules P19	44
2.3.3 Traitement des neurones P19 avec la CP et des inhibiteurs de protéases	45
2.3.4 Analyse morphologique des cultures cellulaires	45
2.3.5 Préparation des lysats cellulaires	46
2.4 Dosage des protéines	46
2.4.1 Méthode micro-Bradford	46
2.4.2 Méthode microBCA	46
2.5 Électrophorèse et immunobuvardage	47
2.5.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	47
2.5.2 Coloration des gels au nitrate d'argent	47
2.5.3 Électrotransfert en mode semi-sec	48
2.5.4 Immunobuvardage de type western	48
CHAPITRE III: RÉSULTATS	50
3.1 Préparation du matériel chromatographique CP-agarose	50
3.1.1 Optimisation du dosage oxydasique de la CP	50
3.1.2 Rendement du couplage	50
3.1.3 Stabilité et résistance de la CP-agarose	57
3.2 Chromatographie d'extraits cellulaires sur CP-agarose	61
3.2.1 Chromatographie d'érythrocytes bovins	61
3.2.2 Chromatographie d'extraits de neurones P19	63
3.2.3 Chromatographie d'extraits de cerveau de rat	65
3.2.4 Profil protéique de la CP dans les extraits de cerveau et le plasma de rat	69
3.3 Voie protéolytique et la neuroagrégation	69
3.3.1 Effet d'inhibiteurs de protéases sur l'action neuroagréative de la CP	69
3.3.2 Analyse de la CP comme cible d'action potentielle des protéases	74
3.3.3 La CP modifie le profil protéique de la reeline	74

CHAPITRE IV: DISCUSSION.....	78
4.1 Dosage oxydasique et caractéristique du matériel chromatographique.....	78
4.2 Interaction de la CP-agarose avec des protéines d'extraits cellulaires	79
4.3 Forme de la CP dans les tissus	83
4.4 Implication d'une activité protéolytique dans l'action neuroagrégate de la CP	85
CONCLUSION	88
BILBIOGRAPHIE	90

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Représentation tridimensionnelle de la CP humaine 3
1.2	Représentation schématique de la structure de la CP 4
1.3	Comparaison structurale de la CP sécrétée et la CP-GPI 7
1.4	Diminution de la réaction de Fenton par l'action de la CP 13
1.5	Représentation du mécanisme d'entrée du fer indépendant de la Tf pour la levure et les cellules de mammifères 17
1.6	Représentation schématique de la migration neuronale 26
1.7	Organisation structurale de la reeline 28
1.8	Schéma de l'organisation des couches neuronales du cortex 30
1.9	Le modèle cellulaire P19 33
1.10	Micrographies de cellules P19 35
1.11	Agrégation des neurones P19 induite par la CP 36
2.1	Résumé du protocole de différenciation neuronale de cellules P19 à l'aide de l'AR. 45
3.1	Dosage de l'activité oxydasique de la CP dans différents milieux réactionnels 51
3.2	Dosage de l'activité oxydasique à deux concentrations de la CP 52
3.3	La CP immobilisée sur l'agarose 54
3.4	Effet du couplage sur l'activité oxydasique de la CP 55
3.5	Stabilité temporelle de l'activité oxydasique de la CP immobilisée sur agarose 58
3.6	Résistance de la CP immobilisée sur agarose aux conditions chromatographiques 60
3.7	Analyse protéique de la chromatographie d'extraits membranaires d'érythrocytes bovins sur CP-agarose 62
3.8	Analyse protéique de la chromatographie d'un lysat neuronal P19 sur CP-agarose 64
3.9	Analyse protéique de la chromatographie d'extraits de cerveaux de rats adultes sur CP-agarose 67
3.10	Formes de la CP dans les extraits de cerveaux et le plasma chez le rat 70
3.11	Effet inhibiteur du SBTI et de l'aprotinine sur l'action agrégative de la CP bovine sur les neurones P19 71
3.12	Caractérisation morphologique de la neuroagrégation induite par la CP, en présence ou non des inhibiteurs de protéases 73
3.13	Profil protéique de la CP dans le milieu neuroconditionné P19 75

3.14	La CP modifie le profil protéique de la reeline	76
------	---	----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1	Résumé d'études de liaison pour la CP. 23
1.2	Résumé d'études de caractérisation structurale de protéines de liaison pour la CP. 24
2.1	Anticorps primaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage. 49
2.2	Anticorps secondaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage..... 49
3.1	Efficacité du couplage de la CP aux billes de CNBr-Sepharose. 56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Ångström
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE-agarose	Aminoéthyl-agarose
ApoCP	Apocéruloplasmine, i.e. céruloplasmine dépourvue des atomes de cuivre
ApoER2	Récepteur-2 de l'apolipoprotéine E (« apolipoprotein E receptor 2 »)
AR	Acide rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BFGF	Facteur de croissance fibroblastique basique (« basic fibroblast growth factor »)
BSA	Albumine sérique bovine
CP	Céruloplasmine
CP-DIG	Céruloplasmine covalamment marquée à la digoxigénine
Cu ⁺	Ion cuivreux
Cu ²⁺	Ion cuivrique
DBS	Sérum de bovin donneur
DIG	Digoxigénine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique (« ethylene diamine tetraacetic acid »)
ERO	Espèces réactives oxygénées
EPR	Résonance paramagnétique électronique
FBS	Sérum fœtal bovin
Fe ²⁺ ou Fe (II)	Ion ferreux
Fe ³⁺ ou Fe (III)	Ion ferrique
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HBSS-Tw	Solution balancée en sels de Hank contenant du Tween-20
HepG2	Lignée cellulaire d'hépatoblastome humain
HIF-1	Facteur-1 inductible par l'hypoxie (« hypoxia-inducible factor-1 »)
HRE	Éléments de réponse à l'hypoxie (« hypoxia-responsive elements »)
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IL-1	Interleukine-1
INF-γ	Interféron-γ

IP	Immunoprécipitation
kDa	Kilodaltons
K_d	Constante de dissociation
K_m	Constante de Michaelis-Menten
KPi	Tampon phosphate de potassium
MEM	Médium essentiel d'Eagle modifié (« modified Eagle Essential Medium »)
M	Concentration molaire
MALDI-TOF	Ionisation par désorption au laser sur matrice-temps d'envol (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight »)
MMP	Métalloprotéinases de la matrice
NB-S	milieu Neurobasal supplémenté
nm	nanomètre
$\cdot O_2^-$	Radical superoxyde
$\cdot OH$	Radical hydroxyle
PBS	Tampon phosphate salin
PAS1	Monomère de glycophorine
PAS2	Dimère de glycophorine
PC	Plaque corticale
pI	Point isoélectrique
pPD	para-phénylènediamine
PVDF	Polyvinylidène difluoré
SBTI	Inhibiteur de trypsine de la fève de soya (« soybean trypsin inhibitor »)
SCO	organe sous-commissural
SDS	Dodécylsulfate de sodium (« sodium-dodecyl sulfate »)
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TBS	Tampon Tris salin
TBS-Tw	Tampon Tris salin contenant du Tween-20
T-EDTA	Trypsine-EDTA
Tf	Transferrine
TNF- α	Facteur onconécrosant alpha (« tumor necrosis factor alpha »)
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
U	Unité d'activité enzymatique

VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« Vascular endothelial growth factor »)
V_{\max}	Vitesse maximale
ZL	Zone laminaire
ZV	Zone ventriculaire

RÉSUMÉ

Le développement du cerveau nécessite une organisation finement régulée du système nerveux. Celle-ci dépend de mécanismes tels que la neurogenèse, la neuromigration et l'élaboration de contacts des neurones avec les cellules voisines et la matrice extracellulaire. Pour ce faire, plusieurs molécules sont mises à contribution, dont des facteurs de croissance, des protéases, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidage ainsi que les composantes de la matrice extracellulaire. La céruloplasmine (CP) est une glycoprotéine à cuivre bleu de 132 kDa. Principalement sécrétée par les hépatocytes dans la circulation systémique, la CP est également exprimée à la surface d'astrocytes dans le cerveau. Elle agit à titre de principal transporteur plasmatique du cuivre, présente des propriétés antioxydantes et possède des activités oxydasique et ferroxidasique. Cette dernière activité fait de la CP un important régulateur du métabolisme du fer dans l'organisme. Nous avons montré dernièrement que la CP peut induire, *in vitro*, l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19. Cette action soulève la possibilité d'un rôle de la CP dans l'organisation du système nerveux en développement. Nous testons l'hypothèse que les mécanismes de cette neuroagrégation pourraient dépendre (1) de l'existence de récepteurs neuronaux de la CP, lesquels pourraient être purifiés par chromatographie d'affinité sur de la CP immobilisée en vue de leur caractérisation, et/ou (2) d'une action de protéases compte tenu que des protéases sont impliquées dans l'organisation du système nerveux en développement. Les résultats montrent que la CP peut être couplée à des billes de CNBr-Sepharose avec une efficacité de 100% pour un rapport de 7 mg de protéine par ml de gel. La CP couplée conserve 57% de son activité oxydasique initiale alors que la protéine libre incubée dans des conditions similaires a perdu 82% de son activité. Ainsi, l'immobilisation a un effet protecteur sur l'activité et donc la conformation de la CP. La colonne chromatographique CP-agarose a permis de retenir spécifiquement une protéine de 30 kDa à partir d'extraits de protéines membranaires d'érythrocytes bovins. Cette protéine pourrait correspondre à la forme monomérique du récepteur érythrocytaire rapporté dans la littérature. Des extraits de cerveaux de rat ont été déplétés de leur CP endogène puis chromatographiés sur un gel de CP-agarose. Une protéine de 45 kDa, éluée de ce gel, est reconnue par un anticorps anti-CP, indiquant une fragmentation de la CP immobilisée par une protéase de l'extrait. Ce fragment pourrait avoir une signification biologique puisqu'une forme immunoréactive de 45 kDa de la CP prédomine dans le cerveau de rats adultes et de nouveau-nés, contrairement à la forme native de 132 kDa qui prédomine dans la circulation. Le SBTI (inhibiteur de trypsine de la fève de soya) et l'aprotinine, des inhibiteurs de protéases à sérine, inhibent l'agrégation de neurones P19 induite par l'addition de CP native *in vitro*. Les neurones traités avec la CP en présence de ces inhibiteurs sont bien répartis sur le support de culture et étendent de nombreux neurites, contrairement aux neurones traités avec la CP seulement. En aucun cas la CP n'est dégradée dans le milieu neuroconditionné. La reeline, une protéase à sérine extracellulaire ayant un rôle établi dans la neuromigration développementale, existe sous des formes de 400, 300 et 180 kDa dans le cerveau, alors que les neurones P19 sécrètent la reeline sous formes de 400 et 180 kDa. Le traitement des neurones avec la CP induit la production de la forme de 300 kDa, production inhibée par le SBTI et l'aprotinine. Alors que l'existence de récepteurs neuronaux de la CP demeure pour le moment évasive, les résultats indiquent qu'une activité protéasique serait impliquée dans l'action neuroagrégative de la CP et que la reeline et non la CP serait une cible de cette activité. L'ensemble du travail supporte donc l'hypothèse que l'action neuroagrégative de la CP *in vitro* reflète l'implication de la protéine dans la neuromigration *in vivo*. Il soulève aussi la possibilité que des fragments physiologiques de la CP aient une action neuroagrégative comme celle de la CP native.

Mots Clés : Céruloplasmine, neurones P19, migration neuronale, reeline, activité protéolytique

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Des études publiées par les Drs J. Paquin, M.A. Mateescu et leurs collaborateurs ont montré que la céruloplasmine (CP) induit l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules P19, des cellules modèles de cellules souches embryonnaires. Il est possible que cette neuroagrégation soit un reflet du phénomène de neuromigration qui se produit durant le développement du système nerveux. Pour bien camper le contexte du présent travail, l'introduction résumera d'abord les propriétés de la CP ainsi que celles de ses récepteurs potentiels et présentera des aspects de la neuromigration développementale avant d'aborder le modèle P19 et les résultats de neuroagrégation induite par la CP dans ce modèle.

1.1 Découverte de la céruloplasmine (CP)

L'origine historique de la découverte de la céruloplasmine (CP) nous ramène aussi loin qu'au milieu des années 1800. À cette époque, quelques chercheurs s'intéressaient à l'étude d'un groupe bien particulier d'enzymes, les oxydases à cuivre, lesquelles étaient connues et isolées chez les plantes. Ces découvertes ont dès lors inspiré à certains chercheurs l'idée que de telles enzymes pourraient ne pas être exclusivement réservées au monde végétal. Durant près de 70 ans, l'existence possible de cupro-oxydases dans le plasma sanguin a été l'objet de nombreux débats. Ce n'est qu'en 1938 que deux chercheurs, T. Mann et D. Keilin de l'Université de Cambridge, ont pour la première fois identifié une protéine à cuivre contenue dans le sang de mammifère (Mann et Keilin, 1938). Ils ont purifié et cristallisé cette protéine, une protéine bleue de 35 kDa qu'ils ont nommée « hæmocuprein ». Malheureusement, cette protéine s'est avérée n'avoir aucune activité enzymatique, donc aucune activité oxydasique normalement retrouvée chez les oxydases isolées de plantes. En 1944, C. Holmberg et son collègue C.-B. Laurell, de l'Université de Lund en Suède, détectent dans un échantillon de sérum sanguin la présence d'une activité oxydasique au moyen d'un substrat bien connu à cette époque comme étant spécifique aux oxydases, le *p*-phénylènediamine (*p*PD). Qui plus est, cette activité semblait de toute évidence reliée à la présence d'une protéine contenant des atomes de cuivre dans sa structure (Holmberg, 1944). Quatre ans plus tard, ces mêmes chercheurs isolent pour la première fois, à partir de sérum de porc, une nouvelle protéine oxydasique à cuivre ayant une taille approximative de 150 kDa et qui, selon leur estimation, comporte environ huit atomes de cuivre par molécule. Ils nommèrent cette protéine « cœruloplasmin », ce qui signifie « sky-blue plasma protein »

(Holmberg et Laurell, 1948). C'est donc à Holmberg et Laurell que revient le mérite de la découverte de la CP.

Bien que la lettre « o » dans le nom original de la protéine ne soit pas prononcé, cette orthographe du mot fut conservée par ses découvreurs durant plusieurs années. Cependant, due à une mauvaise typographie de l'époque, la ligature des lettres « o-e » (œ) du mot « cœruloplasmin » était pratiquement non distinguable de la ligature « a-e » (æ), si bien que les éditeurs ont commencé à utiliser la forme « cæruloplasmin », appellation qui deviendra celle employée par les Britanniques. L'épellation la plus couramment utilisée de nos jours, céruloplasmine (« ceruloplasmin ») est apparue pour la première fois dans les travaux de recherche publiés par Herb Scheinberg et David Gitlin (Scheinberg et Gitlin, 1952). Depuis sa découverte, plusieurs fonctions ont été attribuées à la CP dans l'organisme (voir section 1.4) et elle suscite encore de nos jours l'intérêt de plusieurs chercheurs qui tentent de définir l'étendue de son rôle biologique.

1.2 Caractéristiques structurales de la CP

La CP fait partie de la famille des métalloprotéines cuivriques. Cette famille de protéines se scinde en deux groupes : d'abord les protéines à cuivre bleu, parmi lesquelles on retrouve la CP, mais également la laccase, l'ascorbate oxydase, l'hémocyanine et l'azurine, ainsi qu'un second groupe composé de protéines à cuivre qui ne sont pas bleue, telles l'amine-oxydase sérique et les diamine-oxydases (David et Patel, 2000).

La CP (EC 1.16.3.1) est une glycoprotéine du groupe des α_2 -globulines de par son patron électrophorétique, avec une masse moléculaire approximatif de 132 kDa (Qian et Ke, 2001). Des études récemment effectuées par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont établi la taille moléculaire de la protéine à 125 kDa pour la CP bovine et à 129 kDa pour la CP humaine (Boivin *et al.*, 2001). Chez l'humain, la CP consiste en une seule chaîne polypeptidique constituée de 1046 résidus d'acides aminés et comporte notamment 8,4% de glucides dont 3,5% d'hexose, 2,6% de N-acétylglucosamine, 2,1% d'acide sialique et 0,24% de fucose (Ryden et Bjork, 1976; Zaitsev *et al.*, 1999). Il existe un degré de conservation très élevé de la séquence peptidique de même que de l'expression génique de la CP chez diverses espèces animales (Calabrese *et al.*, 1983; Lockhart et Mercer, 1999). La cristallographie aux rayons-X de la CP humaine, à une résolution de 3.1 Å, révèle qu'une molécule de CP se compose de six domaines arrangés en deux triades, l'une composée des domaines pairs et l'autre des domaines impairs, formant deux pyramides triangulaires emboîtées et permutées l'une par rapport

à l'autre (Vachette *et al.*, 2002). L'arrangement des pyramides est similaire bien que la structure des domaines pairs et impairs se ressemble peu (fig 1.1). La conformation tridimensionnelle est assurée entre autres par la présence de cinq ponts de type disulfure situés à la base des domaines 1 à 5 (David et Patel, 2000).

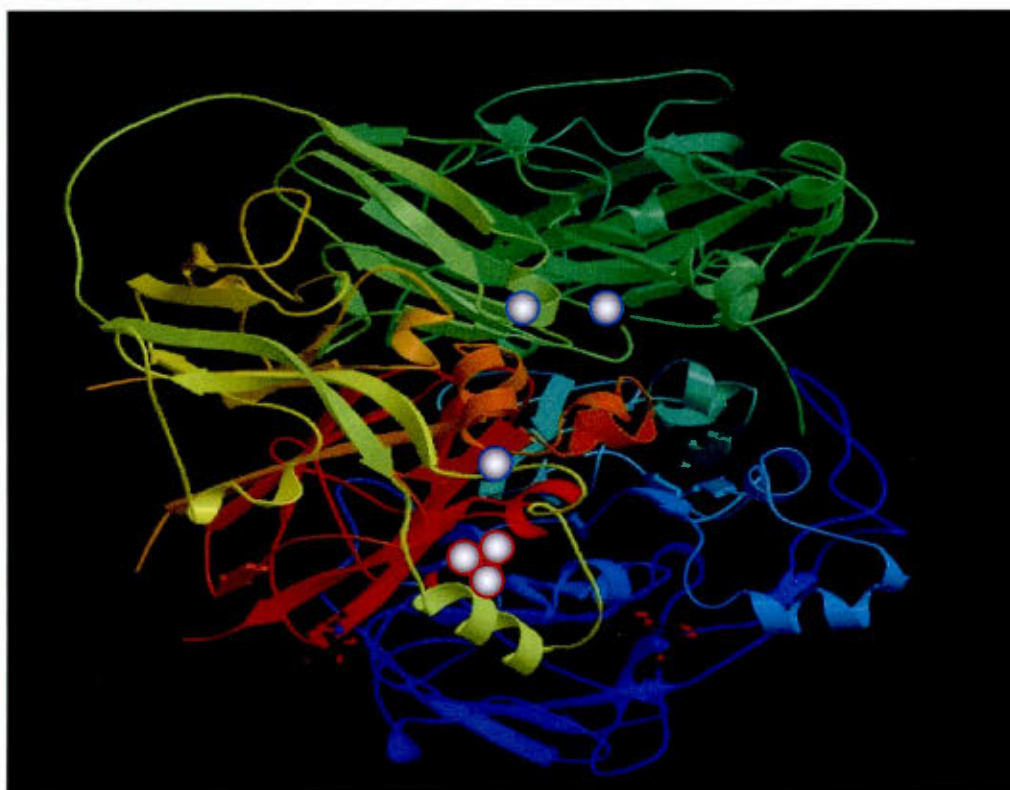
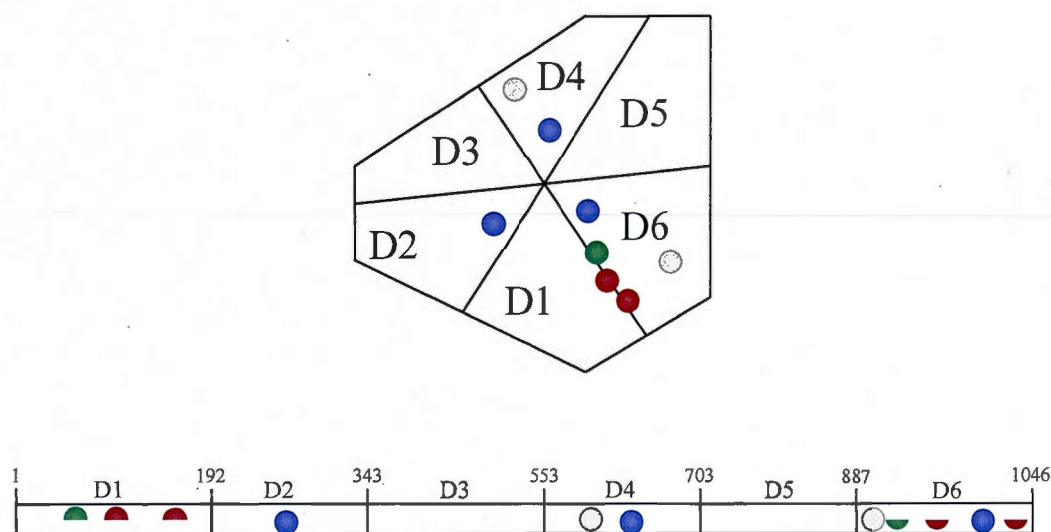


Figure 1.1 Représentation tridimensionnelle de la CP humaine. Les six domaines de la CP sont représentés par six couleurs différentes, rouge (D1), bleu (D2), vert (D3), bleu pâle (D4), jaune (D5) et blanc (D6). La localisation des six atomes de cuivre permanents est représentée par des cercles, les cercles bleus correspondant aux ions de cuivre de type 1 et les cercles rouges correspondant aux ions de cuivre de type 2 et 3 contenus dans le groupement trinuélaire. (Lindley *et al.*, 1997)

Une caractéristique importante de la CP est qu'elle possède six atomes de cuivre « permanents » (fig. 1.1) ainsi que deux sites de liaison supplémentaires occupés de manière partielle par des atomes de cuivre « labiles » (Zaitseva *et al.*, 1996; Lindley *et al.*, 1997). Les six atomes de cuivre « permanents », retrouvés sous forme Cu^{2+} , sont répartis dans les domaines pairs de la protéine ainsi

qu'à l'interface des domaines 1 et 6 (fig 1.2A). Ils sont classifiés selon trois types de coordination qui influencent leurs propriétés spectroscopiques. Les trois atomes de cuivre localisés dans les domaines pairs (2, 4 et 6) sont de type I. Ils sont coordonnés à deux résidus d'histidine, un de cystéine et un de méthionine (Vachette *et al.*, 2002). Ils sont responsables de la couleur bleu céruléen de la protéine ainsi que de son absorbance à 610 nm (Fox *et al.*, 1995; Machonkin *et al.*, 1998).

A



B



Figure 1.2 Représentation schématique de la structure de la CP. A Les relations spatiale et linéaire des six domaines (D1-D6) de la protéine sont montrées, ainsi que la localisation des atomes de cuivre (●, type I; ●, type 2; ●, type III; ○, labile). Les domaines D1 et D6 contiennent chacun ½ site de liaison pour le groupement trinucéaire de cuivre. B Principaux fragments de la CP générés par activité protéolytique *in vivo*. (figure inspirée de Takahashi *et al.*, 1984 et Zaitseva *et al.*, 1996)

Leur présence est nécessaire à l'activité enzymatique de la CP car ils sont impliqués dans le transfert des électrons à titre de receveurs initiaux d'ions de Fe (Puchkova *et al.*, 1997), substrat de l'activité ferroxidasique de la CP. Les trois autres atomes de cuivre forment le cœur trinucéaire catalytique de la CP, à la jonction des domaines 1 et 6. Ce site est constitué d'un atome de cuivre de

type II et deux atomes de type III. Le premier, aussi nommé cuivre « blanc », est coordonné à deux résidus d'histidine ainsi qu'à un résidu d'acide aminé à caractère polaire, et est détectable par résonance paramagnétique électronique (« EPR ») et non par absorbance (Calabrese et Carbonaro, 1986; Calabrese *et al.*, 1988; Zaitseva *et al.*, 1996). Les deux autres atomes de cuivre du centre catalytique sont coordonnés chacun à trois résidus d'histidine et un atome électronégatif tel l'oxygène (O) ou l'azote (N). Ils sont diamagnétiques et montrent une absorbance maximale à 330 nm (Zaitseva *et al.*, 1996). C'est lors de l'acheminement des électrons, médié par les atomes de cuivre I, vers le groupe de cuivre trinucéaire (types II et III) que ces derniers rendent possible la réduction de l'oxygène (David et Patel, 2000). La CP peut également lier des atomes de cuivre labiles au niveau des domaines 4 et 6 (Lindley *et al.*, 1997).

La présence des ions cuivriques au sein de la structure de la CP est importante. Il est montré que la CP dépourvue de ses atomes de cuivre, la forme apoCP, n'a pas d'activité enzymatique. L'apoCP est une forme plutôt instable de la protéine et conséquemment est rapidement dégradée (Gitlin, 1998). Il a été démontré que seulement les ions de cuivre de type I peuvent être soustraits puis réincorporés dans la structure de la protéine sans engendrer d'effets structuraux notables. Leur réinsertion permet aussi de restaurer l'activité enzymatique de la protéine, ce qui laisse présager un rôle de la CP dans le métabolisme du transport systémique du cuivre. Toutefois, la perte du cuivre de type III entraîne, quant à elle, la perte irréversible de la conformation tridimensionnelle de la protéine de même que son activité catalytique (Vachette *et al.*, 2002).

Il a été rapporté que la CP possède des sites sensibles à l'action protéolytique dans sa structure (fig. 1.2B) (Takahashi *et al.*, 1984). Ainsi, la protéine est généralement purifiée du plasma sous forme de deux fragments avoisinants 110-116 kDa et 16-20 kDa. Une métalloprotéase présente dans le plasma pourrait être responsable de ce clivage (Fox *et al.*, 1995). Une méthode de purification de la CP par chromatographie sur aminoéthyl(AE)-agarose décrite par Wang et coll. (1994) et Mateescu et coll. (1999) a permis l'obtention d'une protéine présentant un grand degré de pureté et d'intégrité, c'est-à-dire homogène lorsque analysée électrophorétiquement (une bande unique, sinon majeure, à 132 kDa) et ayant un rapport $A_{610\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ d'une valeur égale ou supérieure à 0,04, l'absorbance à 610 nm étant due au centre cuivrique bleu et l'absorbance à 280 nm au contenu protéique. Cette valeur est un critère solidement établi pour juger de la pureté ainsi que de l'intégrité conformationnelle de la CP (Lovstad, 1981). La CP existe également, quoique moins abondamment, sous une forme possédant un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (voir section 1.3). Cette CP est exprimée notamment dans le cerveau à la surface d'astrocytes (Patel et David, 1997; Salzer *et al.*, 1998).

1.3 Biosynthèse et expression de la CP

La CP est majoritairement synthétisée par les hépatocytes (apoCP) où elle est chargée en ions cuivriques (holoCP) pour être relâchée dans la circulation systémique où elle est notamment responsable du transport de 70 à 95% du cuivre plasmatique (Bowman, 1993; Floris *et al.*, 2000). La glycosylation de la CP a d'importantes répercussions sur la demi-vie de la protéine. Il a ainsi été observé que la CP de rat dépourvue d'acide sialique présente une demi-vie de seulement 15 min alors que la valeur est de 56 h pour la forme native (Morell *et al.*, 1968).

Bien que la CP soit principalement synthétisée dans le foie, bon nombre d'études récentes ont démontré que les cellules hépatocytaires ne sont pas les seules à synthétiser la CP. C'est à l'équipe de Yang et coll. (1986) que revient la primeur d'avoir détecté la première fois, par hybridation *in situ*, la présence d'ARNm codant pour la CP dans les lymphocytes T, les macrophages et les monocytes humains. L'année suivante, on dénote sa présence en grande quantité dans les lignées cellulaires de cancer du colon et du sein (Kunapuli *et al.*, 1987). Les études qui ont suivi ont montré l'expression génique de la CP dans le placenta, les testicules (Aldred *et al.*, 1987), les glandes mammaires (Jaeger *et al.*, 1991), les poumons où une augmentation de l'ARNm a été observée à la suite d'une hyperoxie (Fleming *et al.*, 1991) et les reins (Linder *et al.*, 1998). Il est à noter que selon Fortna et coll. (1999), la forme dominante de la CP dans les cellules de Sertoli est liée à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Différents groupes de chercheurs ont contribué à établir l'existence d'une CP synthétisée dans le cerveau sous une forme comportant l'ancre GPI. La présence de la CP a été ainsi observée par hybridation *in situ* dans le tissu cérébral (Klomp et Gitlin, 1996). Cette forme de CP ne provient pas de la circulation systémique puisque la CP contenue dans le sérum sanguin ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Mollgard *et al.*, 1988; Klomp et Gitlin, 1996). C'est en effectuant une biopsie d'une patiente asiatique présentant des symptômes de dégénérescence neurologique que les chercheurs ont observé la présence de dépôts de fer dans le cerveau, corrélée à une faible concentration sérique en CP (Miyajima *et al.*, 1987). Il a été démontré qu'une maladie liée à une déficience de la CP, l'acéruplasminémie, pouvait engendrer une altération fonctionnelle du métabolisme du fer dans le cerveau (Harris *et al.*, 1995). Ce sont les travaux menés par Patel et David (1997) qui ont permis de démontrer, par des études d'immunohistochimie, qu'il existe une forme de la CP dans le cerveau qui comporte un groupement GPI. Cette CP-GPI est ancrée à la surface d'astrocytes. Elle est synthétisée précisément par une sous-population d'astrocytes qui bordent le réseau microvasculaire ainsi que par

les cellules de Schwann. Cette sous-population astrocytaire est considérée comme étant un constituant de la barrière hémato-encéphalique (Patel et David, 1997). À l'exception du groupement GPI, la CP cérébrale est immunologiquement semblable à la CP sérique (Patel et David, 1997; Salzer *et al.*, 1998). C'est par suite d'un épissage alternatif de l'ARNm que la forme conjuguée au GPI de la CP est générée. Cet épissage alternatif consiste à la substitution des cinq acides aminés C-terminaux de la CP par une séquence de 30 acides aminés hydrophobes (fig. 1.3) qui signale le site d'addition du groupement GPI (Patel *et al.*, 2000).

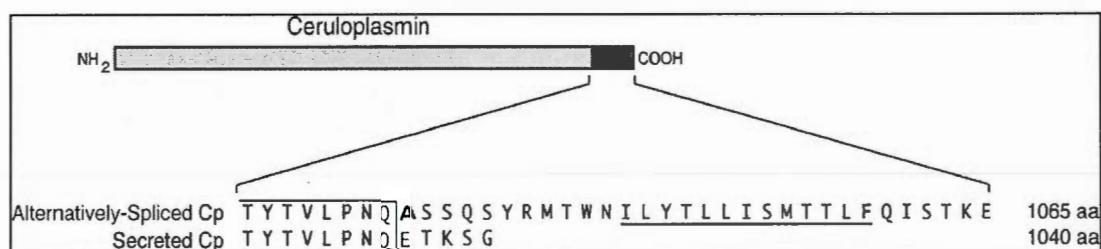


Figure 1.3 Comparaison structurale de la CP sécrétée et la CP-GPI. La forme ancrée à la membrane est obtenue par épissage alternatif. Les acides aminés communs aux deux formes de la protéine sont encadrés. L'ajout de 25 acides aminés à l'extrémité COOH de la séquence protéique permet la conjugaison de la CP au groupement GPI. Les acides aminés soulignés constituent la séquence reconnue par la machinerie enzymatique de conjugaison (Patel *et al.*, 2000).

Le catabolisme de la CP circulante a lieu dans le foie par l'intermédiaire des lysosomes hépatiques. La demi-vie de la CP humaine est de 5 jours, alors qu'elle est de 12 et 54 h respectivement chez le rat et le lapin (Frieden et Hsieh, 1976). Une fois le cycle biologique de la CP complété, elle devient partiellement dépouillée de ses atomes de cuivre, puis est captée au niveau du foie par des récepteurs spécifiques (Tavassoli *et al.*, 1986). Les cellules de l'endothélium hépatique lient puis internalisent la CP du côté luminal par endocytose médiée par un récepteur. Après avoir traversé l'endothélium, via un système vésiculaire, la CP est excrétée du côté abluminal, dans l'espace de Disse, où elle est reconnue et prise en charge par les hépatocytes, par un mécanisme qui implique un récepteur des asialoglycoprotéines (Omoto et Tavassoli, 1990). Le catabolisme de la CP synthétisée dans les tissus extra-hépatiques n'est pas connu.

Il existe plusieurs facteurs susceptibles d'influencer la quantité de CP circulante produite dans l'organisme. Les concentrations de CP augmentent notamment durant la phase aiguë de la réponse inflammatoire, la grossesse et l'infarctus du myocarde, ainsi que dans l'hyperthyroïdisme et certains types de cancer (Cousins, 1985). La CP présente une microhétérogénéité lors de la réponse inflammatoire, laquelle microhétérogénéité résulte de variations structurales au niveau des chaînes carbohydrates (Mackiewicz *et al.*, 1987). À la suite d'un stimulus lié à une condition inflammatoire, la concentration de CP sérique humaine augmente lentement jusqu'à atteindre un niveau de deux à trois fois supérieur au niveau normal lequel, selon l'âge, se situe autour de 150 à 300 µg/mL de sérum. Chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, la concentration en CP sérique peut augmenter jusqu'à près de 900 µg/mL, corrélée à une élévation significative de l'activité oxydasique spécifique de la protéine (Louro *et al.*, 2000).

Des études réalisées *in vitro* ont démontré que certaines hormones agissent sur la biosynthèse et la sécrétion de la CP. C'est le cas de l'adrénaline qui accroît l'activité oxydasique ainsi que la concentration d'ions de cuivre dans le sérum (Evans, 1973). Par ailleurs, une déficience en fer peut également entraîner une augmentation du taux de CP plasmatique (Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Enfin, il a été mis en évidence dans une lignée cellulaire d'hépatome humain que l'interleukine-1 (IL-1), le facteur onconécrosant (TNF) et le facteur-1 de stimulation hépatique (HSF1) induisent chacun la synthèse de CP (Mackiewicz *et al.*, 1987).

Les recherches les plus contemporaines concernant les régions régulatrices situées sur le gène de la CP de même que les facteurs qui influencent la transcription de ce gène n'apportent que peu d'élément nouveau. Les travaux de Mukhopadhyay et coll. (2000) ont mis en évidence un mécanisme moléculaire expliquant l'augmentation de la concentration sérique de CP provoquée par une déficience en fer ionique dans l'organisme. Ce mécanisme implique la présence de trois paires d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE ou « hypoxia-responsive elements ») au niveau de la région 5' du gène de la CP humaine ainsi que la liaison d'un de ces HRE avec le HIF-1 (« hypoxia-inducible factor-1 ») (Mukhopadhyay *et al.*, 2000). Il a également été rapporté qu'une interaction entre le promoteur du gène de la CP de rat et les protéines α et β se liant aux séquences « CCAAT/enhancer » pouvait être impliquée (Bingle *et al.*, 1993). Fait intéressant, l'expression de la CP peut être régulée post-transcriptionnellement mais avant la traduction. Ainsi, la synthèse de la CP peut être contrôlée par l'interaction de « l'INF- γ inducible RNA-binding protein », une protéine de liaison à l'ARN, et la région 3' non traduite de l'ARNm de la CP (Mazumder et Fox, 1999). Conséquemment, l'association du transcrit de la CP avec les ribosomes est bloquée et la traduction suspendue.

1.4 Principaux rôles associés à la CP

La CP aurait différents rôles biologiques, ce qui fait d'elle une protéine multifonctionnelle. Certains de ces rôles seraient liés à ses activités oxydasique (e.g. régulation des amines biogènes) et ferroxidasique (e.g. régulateur du métabolisme du fer, enzyme antioxydante), ainsi qu'à sa capacité de transporter le cuivre (e.g. régulateur du métabolisme du cuivre, angiogénèse). D'autres rôles sont proposés sur la base des conditions qui stimulent la biosynthèse de la CP (e.g. inflammation). Enfin, de nouveaux rôles ont été soulevés dont les mécanismes demeurent inconnus.

1.4.1 Activité catalytique de la CP

La CP est une oxydase (EC 1.16.3.1) qui catalyse l'oxydation de différents substrats. Toutefois, la CP fait partie d'un type particulier d'oxydases puisqu'elle génère de l'eau, contrairement aux oxydases dites classiques qui libèrent du peroxyde d'hydrogène (David et Patel, 2000). Outre la CP, on retrouve également la laccase et l'ascorbate oxydase végétales qui produisent elles aussi de l'eau. La CP catalyse l'oxydation de plusieurs produits phénoliques et amines aromatiques tels les catécholamines, des aminophénols, des amines biogènes et des diamines aromatiques, dont le *p*PD (Sunderman et Nomoto, 1970). À ce propos, la CP présente une forte affinité pour le *p*PD, qui est depuis plus de 30 ans le substrat le plus couramment utilisé pour le dosage de l'activité oxydasique *in vitro* (Fox, 2003).

La CP est également reconnue en tant que ferroxidase. Cette fonction, essentielle à l'organisme, fut démontrée pour la première fois en 1960 par les chercheurs Curzon et O'Reilly, du « National Hospital in London » situé en Angleterre (Curzon et O'Reilly, 1960). Ils ont décrit le mécanisme qui permet, en présence de la CP, d'oxyder les ions ferreux (Fe^{2+}) pour former des ions ferriques (Fe^{3+}). Le Fe^{2+} est le substrat pour lequel la CP présente l'affinité la plus forte (Curzon, 1961; Frieden, 1981). Cette activité ferroxidasique fait de la CP un antioxydant important (voir section 1.4.4) et un régulateur métabolique essentiel du fer (voir section 1.4.7).

L'activité enzymatique de la CP peut être inhibée par 7 types d'inhibiteurs : les anions organiques, des carboxylates, des composés thiols, des agents chélateurs, des hydrazines, des 5-hydroxyindoles et certains ions métalliques. Les inhibiteurs les plus puissants sont les anions inorganiques CN^- et N_3^- (Frieden et Hsieh, 1976).

1.4.2 Régulateur des amines biogènes

Des études suggèrent que la CP puisse réguler, via son activité oxydasique, la concentration d'amines biogènes aussi bien dans le sérum que dans les tissus. À ce propos, une étude réalisée au milieu des années 1970 a montré que certains tranquillisants et antidépresseurs influent sur l'oxydation des amines biogènes catalysée par la CP. Il a été suggéré que la CP puisse agir comme régulateur de la concentration de noradrénaline et de sérotonine (Barrass *et al.*, 1974). Les effets de tranquillisants de type phénothiazine sur l'activité oxydasique de la CP ont également démontré son rôle dans l'oxydation de catécholamines, comme la noradrénaline, et la dopamine (de Mol, 1985). Le mécanisme proposé implique que l'interaction de ces composés avec la CP permet le transfert de charges entre les catécholamines et les ions cuivriques de la CP (de Mol, 1985). Récemment, des sites de liaison potentiels pour les amines biogènes ont été identifiés dans le domaine 6 de la CP, soutenant le rôle de la protéine dans la régulation de ces composés (Zaitsev *et al.*, 1999). Comme la CP se retrouve non seulement dans la circulation systémique mais aussi dans le cerveau, riche en amines biogènes, il est possible que la CP influe sur le fonctionnement de certains processus tels la neurotransmission et le développement neuronal (Shepherd, 1994).

1.4.3 Transport du cuivre

Les grandes civilisations anciennes ont reconnu beaucoup d'importance au cuivre dans la promotion d'une bonne santé (Fox, 2003). Des investigations scientifiques effectuées au début du 20^e siècle ont su démontrer l'importance du cuivre au sein du métabolisme humain. Ainsi, en 1928, l'équipe composée de Hart, Elverhjem et coll. a démontré pour la première fois le rôle important du cuivre dans la biosynthèse de l'hémoglobine et ce, par le biais d'études portant sur la chlorose, une forme particulière d'anémie sidéropénique chez les jeunes filles (Fox, 2003). Cette découverte a considérablement contribué aux idées déjà véhiculées à l'époque concernant le rôle spécifique du cuivre dans le métabolisme du fer et la formation du sang. Depuis, il a été démontré que le cuivre est impliqué dans le fonctionnement de plusieurs enzymes dont la CP. Également, cet élément influe sur la croissance, l'élaboration d'une bonne ossature, la maturation des globules rouges et blancs, la contractilité du myocarde, le transport du fer, le métabolisme du glucose et le développement du cerveau (Olivares et Uauy, 1996).

La CP est le principal transporteur sérique de cuivre dans l'organisme, liant jusqu'à 95 % du cuivre circulant (Waggoner *et al.*, 1999). La CP pourrait assurer ainsi l'apport en cuivre aux tissus de tout

l'organisme, où il est utilisé dans la synthèse d'enzymes comme la cytochrome-C-oxydase, la lysyl-oxydase, la superoxyde dismutase (SOD), la tyrosinase et la dopamine- β -hydrolase (Frieden, 1986). Les événements menant à la livraison du cuivre par la CP demandent encore à être élucidés. Il a été démontré, au moyen de la lignée cellulaire érythroleucémique K562, que la CP se lie à la membrane de ces cellules puis transfère les ions de cuivre à la suite d'une réduction qui faciliterait leur déchargement (Percival et Harris, 1991). Le cuivre, libéré de la CP, est par la suite retrouvé lié à la SOD dépendante de Cu-Zn, l'enzyme cytosolique la plus abondante des cellules K562. Il est à noter que la CP ne pénètre pas dans la cellule lors de son interaction pour livrer le cuivre, mais se dissocie de la membrane plasmique à la suite du transfert du cuivre, pour se retrouver dans le milieu extracellulaire. D'autres études faites sur des préparations tissulaires cardiaques et cérébrales ont consolidé le fait que la livraison du cuivre par la CP ne demande pas l'endocytose de la protéine (Orena *et al.*, 1986). Il semblerait que seul le catabolisme de la CP au niveau du foie et qui mène à son élimination fasse appel à l'endocytose de la protéine (Omoto et Tavassoli, 1990).

Des résultats ont récemment suscité un doute sur l'existence d'un rôle de la CP comme livreur de cuivre. Ainsi, une étude a montré que l'inactivation du gène de la CP chez la souris (CP^{-/-}) n'a pas perturbé l'absorption, le transport, la distribution et l'excrétion du cuivre dans l'organisme (Meyer *et al.*, 2001). Une corrélation existe entre ces résultats et ceux d'une étude nutritionnelle qui avait conclu que le transfert d'ions cuivriques par la CP serait trop lent pour attribuer à celle-ci un rôle d'instance dans le métabolisme du cuivre (Gitlin et Janeway, 1960). Enfin, il est rapporté qu'il n'existe aucune différence notoire de l'excrétion biliaire du cuivre, la voie majeure d'élimination du cuivre, entre la souris knockout pour le gène de la CP et l'individu de type sauvage (Meyer *et al.*, 2001). Ces études questionnent donc le rôle que joue la CP dans le transport du cuivre et indiquent à tout le moins la nécessité d'études plus approfondies. Il reste plausible qu'en absence de CP, l'organisme développe un mécanisme compensatoire pour effectuer le transport du cuivre. À titre d'exemple, l'albumine, protéine très abondante dans le plasma sanguin, agit comme transporteur de plusieurs types de métaux dont le cuivre.

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre la CP et certaines déficiences du métabolisme cuivrique, soient la maladie de Wilson et celle de Menkes. La maladie de Wilson est causée par une mutation d'une ATPase de type P, l'ATP7B, responsable du transport du cuivre au niveau du Golgi. La mutation entraîne une diminution de l'incorporation du cuivre dans l'apoCP. Les ions cuivriques s'accumulent donc dans les hépatocytes et favorisent notamment la production de radicaux libres oxygénés, provoquant des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides, et le développement d'une

cirrhose du foie (Vassiliev *et al.*, 2005). De plus, on note une accumulation anormale de cuivre dans des structures du cerveau (e.g. noyaux lenticulaires, noyaux gris sous-thalamiques). L'accumulation de cuivre dans le cerveau est étroitement associée à certaines maladies neurodégénératives (Vassiliev *et al.*, 2005). La maladie de Wilson est fortement corrélée avec une faible concentration sérique de CP (Seo, 2006). La maladie de Menkes quant à elle est provoquée par la perte de fonction d'un autre transporteur de cuivre, l'ATP7A, ce qui entraîne un défaut d'absorption du cuivre dans le tractus gastro-intestinal, le placenta et la barrière hématoencéphalique. Il en résulte une déficience en cuivre et une perte d'activité des enzymes à cuivre, dont la CP (Kamolsilp, 2005). Des études suggèrent que des anomalies de la CP et du métabolisme du cuivre puissent être impliquées dans le développement de certaines maladies de dégénérescence neurologique telle la schizophrénie (Wolf *et al.*, 2006).

1.4.4 Propriétés antioxydantes

Les cellules fonctionnant selon un mode aérobique sont, en conditions normales, aptes à contrer les dommages provoqués par la présence d'espèces réactives oxygénées (ERO) (Chiu *et al.*) telles que les radicaux superoxydes ($\cdot O_2^-$), les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces ERO produites en excès lors d'un stress oxydatif, sont neutralisées par des enzymes spécialisées intracellulaires comme la SOD, la catalase et la glutathion-peroxydase (Gutteridge, 1983). Également, l'organisme dispose de molécules antioxydantes extracellulaires pour contrer ou réduire les effets pro-oxydatifs telles la peroxydation des lipides membranaires et la mort cellulaire. L'activité antioxydante de la CP a été démontrée à plusieurs reprises, *in vitro* comme *ex vivo* (Stocks *et al.*, 1974; Goldstein *et al.*, 1979; Goldston *et al.*, 1984; Dumoulin *et al.*, 1996; Atanasiu *et al.*, 1998; Aouffen *et al.*, 2001). Elle serait même, selon certains auteurs, l'antioxydant le plus important contenu dans le sérum sanguin, jouant un rôle critique durant la réponse inflammatoire (Stocks *et al.*, 1974; Goldstein *et al.*, 1979).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer son rôle actif dans la prévention des dommages causés par le stress oxydatif. L'un de ces mécanismes implique une compétition entre l'activité ferroxidasique de la CP et la réaction de Fenton pour l'utilisation d'ions ferreux et leur conversion en ions ferriques (Gutteridge, 1985). La réaction de Fenton consiste en la génération de radicaux $\cdot OH$ à partir de H_2O_2 en présence de Fe^{2+} . En transformant le Fe^{2+} en Fe^{3+} , la CP diminue le pool de Fe^{2+} et empêche ainsi la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton (fig 1.4).

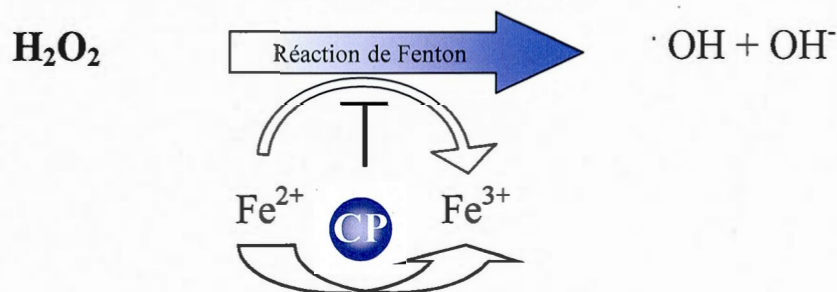


Figure 1.4 Diminution de la réaction de Fenton par l'action de la CP. En transformant le Fe^{2+} en Fe^{3+} , la CP diminue le pool de Fe^{2+} et empêche ainsi la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton.

Un autre mécanisme de l'action antioxydante de la CP dépend de la capacité de piéger certaines ERO. Des études ont montré que la CP peut piéger les radicaux $\cdot\text{O}_2^-$ en catalysant la dismutation du radical (Goldstein *et al.*, 1979). Dans des conditions physiologiques, la CP réagit seulement de manière stoechiométrique avec ce radical, i.e. qu'elle le lie sans transformation catalytique (Marklund, 1986). La CP peut également réagir avec le H_2O_2 de manière stoechiométrique (Calabrese et Carbonaro, 1986). Il a été démontré que la CP provoque la terminaison de chaînes de réactions radicalaires pour une variété de radicaux libres oxygénés (Atanasiu *et al.*, 1998).

Différentes études ont mis en évidence le rôle protecteur de la CP dans divers tissus ou cellules exposés à des conditions de stress oxydatif. La CP protège le cœur isolé contre les radicaux libres produits par électrolyse du tampon de perfusion (Chahine *et al.*, 1991; Mateescu *et al.*, 1995) ou par une ischémie-reperfusion (Atanasiu *et al.*, 1995; Dumoulin *et al.*, 1996), prévient les dommages causés par la reperfusion lors de transplantation rénale (Baron *et al.*, 1991) et inhibe l'oxydation des lipides de préparations de membranes cellulaires ou de vésicules artificielles (Al-Timimi et Dormandy, 1977; Goldstein *et al.*, 1979; Yamashoji et Kajimoto, 1983). Il est suggéré que la CP joue un rôle prépondérant comme mécanisme de défense dans le tissu pulmonaire à la suite d'une hyperoxie, la présence d'ARNm de la CP étant particulièrement augmentée dans cette condition (Fleming *et al.*, 1991). Enfin, il est rapporté que la CP prévient, de par son activité antioxydante, l'endommagement de protéines et de l'ADN et protège les cellules des dommages et de la lyse normalement induits par les radicaux libres (Fox *et al.*, 1995). Par contre, des études effectuées par l'équipe de P.Fox (1995) indiquent que la CP peut stimuler l'oxydation de lipides membranaires, possiblement par le

relâchement de ses ions de cuivre. Un équilibre entre les actions antioxydantes et pro-oxydantes de la CP pourrait dépendre de son intégrité structurale (Fox *et al.*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 1997).

1.4.5 Protéine de phase aiguë

La CP est considérée comme une protéine de phase aiguë puisque sa présence augmente durant les premiers stades de l'inflammation ou d'une infection (Cousins, 1985). Ses propriétés antioxydantes et son activité ferroxidasique, de même que sa capacité de transporter le cuivre suggèrent un rôle de protection lors de la réponse inflammatoire. Ainsi, la CP peut d'une part piéger et neutraliser les ERO produites par les neutrophiles et les macrophages pour éviter la production de dérivés plus toxiques (Cousins, 1985). D'autre part, la CP, de par son activité ferroxidasique, diminue la formation de $\cdot\text{OH}$. Elle peut aussi transférer le fer à la transferrine (Tf), ce qui contribue à l'élimination de cet élément du site d'inflammation et donc, diminue le risque de formation de ERO (Mazumder *et al.*, 1997). Finalement, comme le cuivre possède des propriétés anti-inflammatoires, il est possible que la CP puisse participer à la réponse de phase aiguë en approvisionnant la région lésée en cuivre (Berthon, 1993; Jackson *et al.*, 2000).

1.4.6 Rôle dans l'angiogenèse

Des études ont montré que, contrairement à l'apoCP (dépourvue de cuivre), la CP native, ses fragments contenant du cuivre, des sels de cuivre ou d'autres molécules capables de complexer le cuivre, ont des propriétés pro-angiogéniques (McAuslan et Reilly, 1980; Raju *et al.*, 1982). Des propriétés pro-angiogéniques du cuivre ont été mises en évidence au début des années 1980 par des études qui ont montré que les ions de cuivre Cu^{2+} et Cu^+ , utilisés à une concentration de 10^{-6} M, induisent la migration de cellules endothéliales de l'aorte bovine (Alessandri *et al.*, 1983; McAuslan *et al.*, 1983). Jusqu'à ce jour, les mécanismes de l'induction de la migration cellulaire par le cuivre ne sont pas bien élucidés (Lowndes et Harris, 2004). Toutefois, il est reconnu que l'augmentation de la concentration cuivrique dans le sérum est corrélée avec une activation de facteurs pro-angiogéniques tels le VEGF (« vascular endothelial growth factor »), le BFGF (« basic fibroblast growth factor »), le TNF- α (« tumor necrosis factor alpha ») et IL-1 (Nasulewicz *et al.*, 2004). Le rôle possible de la CP dans le processus d'angiogenèse proviendrait du fait que la protéine renferme des atomes de cuivre dans sa structure (Raju *et al.*, 1982). Des études ont montré que la concentration sérique de la CP augmente en présence de tumeurs autant chez l'homme que chez les animaux (Ungar-Waron *et al.*, 1978; Linder *et al.*, 1979). Précisément, l'ARNm de la CP est trois fois plus élevé dans les lignées de

cellules cancéreuses du foie comparativement aux cellules saines (Kunapuli *et al.*, 1987), possiblement en relation avec le fait que les cellules tumorales stimulent une angiogenèse pour assurer leur survie.

1.4.7 Régulateur du métabolisme du fer

Il était clairement reconnu dès les années 1960 que la CP possède une activité ferroxidasique (Curzon, 1961), sans toutefois extrapoler cette activité catalytique à un rôle clé dans le métabolisme du fer. C'est dans une publication datant de 1966 que trois chercheurs ont identifié pour la première fois la signification physiologique de l'oxydation du fer par la CP (Osaki *et al.*, 1966). De par son activité ferroxidasique, la CP augmente l'incorporation d'ions ferriques (Fe^{3+}) dans la transferrine (Tf) via un mécanisme consommant de l'oxygène de manière stoechiométrique, ce qui résulte en une augmentation de la biodisponibilité du fer pour les cellules (Osaki *et al.*, 1966). Ces résultats suggérant une implication de la CP dans le métabolisme du fer ont pourtant suscité une grande controverse dans le milieu scientifique. L'auto-oxydation rapide du Fe^{2+} , l'incapacité du Fe^{3+} à se lier à l'apo-Tf (Bates *et al.*, 1973), le métabolisme normal du fer chez les patients souffrant de la maladie de Wilson et qui présentent un taux faible de CP étaient les arguments avancés à l'époque en défaveur d'un rôle important de la CP (Roeser *et al.*, 1970). Depuis, différentes études ont démontré le rôle prépondérant de la CP dans l'homéostasie du fer (Xu *et al.*, 2004; Ke *et al.*, 2006; Wolf *et al.*, 2006).

Le fer est un élément essentiel à une multitude de processus biologiques notamment en tant que cofacteur de plusieurs enzymes comme les cytochromes de la chaîne de transport d'électrons, ou la ribonucléotide-réductase qui contrôle la production de désoxyribonucléotides durant la synthèse de l'ADN. Or, des quantités excessives d'ions de fer peuvent être irrémédiablement dommageables pour les cellules. Des accumulations de fer sont associées à certaines maladies neurodégénératives, au vieillissement, à l'athérosclérose, au cancer et à diverses infections microbiennes (Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Conséquemment, les cellules sont dotées de mécanismes finement régulés qui permettent de contrôler les niveaux de fer. À cet égard, plusieurs protéines et enzymes sont sollicitées dans la mobilisation, le transport et la séquestration du fer dans l'organisme (de Silva *et al.*, 1996; Kaplan et O'Halloran, 1996). La CP fait partie de ces intervenants majeurs de l'homéostasie du fer (Qian et Ke, 2001). Elle régirait l'efflux du fer par les cellules de même que l'influx Tf-dépendant et l'influx Tf-indépendant.

Il est bien reconnu que lorsque la CP oxyde le fer, elle en favorise du même coup l'incorporation dans l'apo-Tf (Qian et Ke, 2001). La CP et la Tf étant localisées du côté extracellulaire, il a été

proposé que l'interaction de ces deux protéines pourrait stimuler la libération d'ions de fer par les cellules en générant un gradient de concentration à travers la membrane cellulaire (Osaki *et al.*, 1971). Cet idée fut confirmée par différentes études qui ont démontré que la CP augmente la libération de fer des cellules (Osaki *et al.*, 1971; Richardson, 1999). Une observation importante supportait aussi cette ligne de pensée. Les personnes souffrant d'acéruloplasminémie, une déficience héréditaire en CP, montrent un faible niveau de fer dans le sérum, corrélé à une accumulation de cet élément dans certains organes dont le foie et le cerveau (Harris *et al.*, 1995). Récemment, une étude a démontré de manière éloquent, à partir de souris CP^{-/-}, que l'accumulation de fer dans ces organes est causée par une altération de la sortie de fer des cellules, et non causée par des problèmes d'absorption de fer par l'organisme ou encore par des problèmes d'entrée de fer dans les cellules (Harris *et al.*, 1999). Ainsi, la CP joue bien un rôle physiologique essentiel dans la régulation de la libération du fer dans certains types cellulaires.

Il existe une littérature bien documentée sur la Tf et son rôle à titre de pourvoyeur de fer pour les cellules. Il apparaît donc plausible de penser que la CP pourrait être impliquée dans les mécanismes d'entrée de fer. La voie d'entrée du fer dépendante de la Tf implique un système majoritairement retrouvé au niveau des précurseurs érythroïdes (de Silva *et al.*, 1996). Dans ce mécanisme, la Tf diférique [Tf(Fe)₂], associée à son récepteur membranaire, est d'abord endocytosée par la cellule, où elle relâche son contenu en fer, puis est recyclée vers la membrane plasmique avec son récepteur (de Silva *et al.*, 1996). Ainsi, en contribuant à l'incorporation du fer dans la Tf, la CP contribue indirectement à l'assimilation du fer par la voie dépendante de la Tf.

La CP est capable d'augmenter l'internalisation du fer dans des cellules qui ne produisent pas la Tf, notamment dans les cas de cellules isolées à partir de patients atteints d'hémochromatose, une maladie héréditaire qui entraîne des défauts d'absorption de fer dans les cellules. Ces études suggèrent qu'il existe une voie indépendante de la Tf qui permet l'internalisation du fer (Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Le fonctionnement de cette voie n'est pas encore bien compris, mais il pourrait ressembler à celui qui a été élucidé chez la levure. Dans cet organisme, le mécanisme (fig. 1.5A) fait intervenir une ferriréductase transmembranaire (Fre1p/2p), une ferroxidase transmembranaire (Fet3p) et un transporteur de Fe³⁺ transmembranaire (Ftr1) dont les structures géniques ont été élucidées. Des travaux ont révélé une homologie de séquence entre Fet3p et la CP (De Silva *et al.*, 1995; Askwith et Kaplan, 1997; de Silva *et al.*, 1997). Fet3p est une protéine à cuivre de haut poids moléculaire (100-120 kDa) et, tout comme la CP, catalyse l'oxydation des ions ferreux de même que de plusieurs autres composés organiques (de Silva *et al.*, 1997). Cependant, Fet3p possède un segment transmembranaire

contrairement à la CP qui est non membranaire (Dancis *et al.*, 1992; Kaplan et O'Halloran, 1996; Stearman *et al.*, 1996). En raison de la ressemblance existant entre Fet3p et la CP, un modèle de l'entrée du fer dans les cellules de mammifères a été proposé. Ce modèle (fig. 1.5B) implique, en plus de la CP, une ferriréductase et un transporteur d'ions Me^{3+} qui demeurent encore hypothétiques.

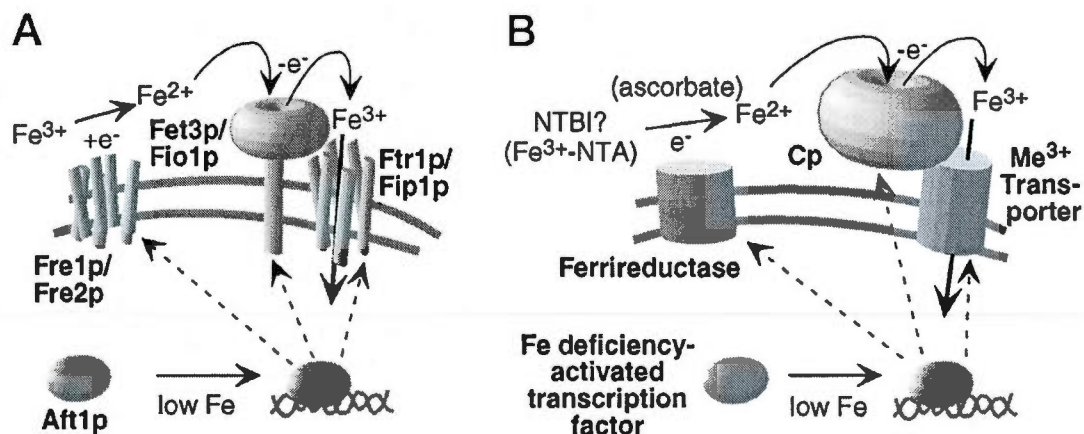


Figure 1.5 Représentation du mécanisme d'entrée du fer indépendant de la Tf pour la levure et les cellules de mammifères. **A** Entrée de fer dans *S. cerevisiae* et *S. pombe*. Selon ce modèle, la ferriréductase Fre1p/Fre2p initie l'entrée de fer en convertissant le Fe^{3+} en Fe^{2+} au niveau extracellulaire. Le fer réduit est immédiatement réoxydé en Fe^{3+} par Fet3p/Fio1p, une ferroxydase semblable à la CP. Le Fe^{3+} est transporté au niveau intracellulaire par Ftr1p (ou Fip1p), un transporteur à six segments transmembranaires qui interagit avec Fet3p (ou Fio1p). **B** Entrée de fer stimulée par la CP dans les cellules de mammifères. Ce mécanisme impliquerait une ferriréductase et un transporteur de cations spécifique aux Me^{3+} qui demeurent à être identifiés. La ferroxydase chez les mammifères est la CP, une enzyme sécrétée, contrairement à Fet3p (Fio1p) qui est membranaire. Comme chez la levure, une déficience en fer stimulerait la transcription de la ferriréductase, de la ferroxydase et du transporteur de Me^{3+} (Attieh *et al.*, 1999).

Une étude fait mention d'une augmentation de l'entrée de ^{55}Fe chez les cellules hépatiques HepG2 déficientes en fer via l'action de la CP et ce, selon un mécanisme indépendant de la Tf. Elle fait également mention que la privation de fer entraîne, au niveau de la transcription, la biosynthèse de CP par les hépatocytes HepG2 de même que la synthèse de Fep3 par *S. cerevisiae* (De Silva *et al.*, 1995; Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Il y a quelques années, il a été démontré que la CP peut stimuler l'entrée de fer dans les cellules érythroleucémiques K562 par un mécanisme impliquant un transporteur spécifique de cations trivalents (Attieh *et al.*, 1999).

Tout comme dans le cas de la Tf, il a été montré que la CP peut également favoriser l'incorporation de fer dans la ferritine (Juan et Aust, 1998). La ferritine est une protéine intracellulaire d'environ 500 kDa, composée de deux chaînes protéiques nommées H et L. Elle est responsable de l'entreposage du fer au niveau intracellulaire, sous une forme non toxique pour la cellule. La quasi totalité du fer entreposé dans la cellules est sous forme d'ions ferriques dans la ferritine. Toutefois, le rôle de la CP dans le chargement de la ferritine demeure encore nébuleux. Cependant, il est connu que ce mécanisme implique à tout le moins une étape qui passe par l'interaction de la chaîne H de la ferritine avec la CP et la stimulation subséquente de l'activité ferroxydasique de la CP (Van Eden et Aust, 2000). L'ion ferrique peut dès lors être incorporé dans la ferritine via les quatre hélices α_2 de la chaîne H (Juan et Aust, 1998). Ce processus est répété jusqu'à ce que la ferritine soit totalement chargée en ions ferrique (Van Eden et Aust, 2000). Il est à noter que ces études ont été effectuées dans un modèle acellulaire où la CP et la ferritine n'étaient pas séparées par une membrane plasmique; conséquemment, aucune donnée ne permet de confirmer l'existence d'un tel mécanisme au niveau cellulaire (Van Eden et Aust, 2000).

En 1987, des chercheurs ont caractérisé une maladie autosomale récessive héréditaire dont les symptômes étaient très ressemblants à ceux de la maladie de Parkinson. Les différents symptômes tels que le diabète sucré, la dégénérescence de la rétine, la neurodégénération avec blépharospasme, ont été corrélés à une absence de CP (Miyajima *et al.*, 1987). Des analyses génétiques ont montré quelques mutations spécifiques dans le gène de la CP, lesquelles dans tous les cas, menaient à un décalage du cadre de lecture de l'ADN lors de la transcription, résultant en une protéine dont l'activité enzymatique est irréversiblement altérée (Xu *et al.*, 2004). De plus, les symptômes étaient accompagnés d'accumulations excessives de fer dans le pancréas, la rétine et le cerveau. Ces résultats ont permis d'identifier cette nouvelle maladie du nom d'acéruloplasminémie, et ont mené à une découverte majeure dans la compréhension de l'importance physiologique de la CP au sein du métabolisme du fer. L'explication retenue actuellement veut qu'en absence de CP les ions ferreux soient pris en charge par les cellules du parenchyme du cerveau. L'accumulation du fer à cet endroit provoque des dommages spécifiques aux cellules et entraîne la perte de facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales et essentiels pour la survie neuronale (Harris *et al.*, 1999). Des résultats ont montré chez des souris CP^{-/-} que l'accumulation de fer dans les organes est due à une altération de la sortie du fer cellulaire (Harris *et al.*, 1999). Enfin, plusieurs preuves suggèrent que des déficiences du métabolisme du fer, en association à des défauts de la CP, seraient impliquées dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Huntington (Berg et Hochstrasser, 2006).

1.4.8 Autres actions de la CP

Durant la dernière décennie, différentes études ont soulevé d'autres fonctions potentielles de la CP. Ainsi, elle agirait notamment sur des canaux à potassium pour induire une dépolarisation membranaire de cellules de neuroblastome (Wang *et al.*, 1995). Une étude a montré une action de la CP sur la durée de la période réfractaire du cœur isolé et suggéré que cette action pourrait passer par des canaux potassiques (Atanasiu *et al.*, 1996). D'autres études soulèvent maintenant la possibilité que la CP puisse moduler le métabolisme de l'oxyde nitrique, notamment par une activité de S-nitrosylation de résidus de cystéine (Mani *et al.*, 2004). Récemment, il a été démontré par l'équipe de la Dre Paquin que la CP aurait une action neuroagrégate sur des cultures de neurones nouvellement différenciés de cellules embryonnaires P19, ce qui pourrait indiquer un rôle dans la neuromigration lors du développement du système nerveux. Les mécanismes de ces diverses actions et leur signification biologique ne sont pas connus. Le présent mémoire s'est intéressé à la compréhension de ce nouveau phénomène de neuroagrégation induite par la CP (voir section 1.7).

1.5 Protéines de liaison de la CP

C'est au tournant des années 1980 que les chercheurs ont commencé à s'intéresser à l'existence possible de récepteurs spécifiques de la CP, leur distribution et leur signification biologique. C'est Frieden qui le premier postula la présence d'un récepteur spécifique de la CP à la surface membranaire (Frieden, 1980). La majorité des études entreprises sur les récepteurs de la CP ont utilisé des analyses de liaison avec de la CP marquée ou ont réalisé une caractérisation structurale partielle en combinant chromatographie d'affinité (ou réticulation croisée) et électrophorèse.

Le tableau 1.1 résume les résultats d'études de liaison. Des sites de liaison spécifique ont été observés dans des extraits membranaires de tissus aortique et cardiaque de poulet ainsi que de foie et de cerveau. Des études additionnelles ont permis de montrer que des récepteurs de la CP étaient également présents dans les cellules sanguines incluant les érythrocytes, les monocytes, les granulocytes et les lymphocytes. L'existence de sites de liaison a été également montrée au niveau des cellules endothéliales hépatiques et de fibroblastes HT-1080. Il ressort de l'ensemble de ces études de liaison des valeurs de K_d variant de 1 nM à 500 nM. La détermination du nombre de sites de liaison varie aussi d'une étude à l'autre. Par exemple, le nombre de sites de liaison est beaucoup moins élevé sur les érythrocytes, comparativement à ceux retrouvés dans les cellules endothéliales du foie de même que pour les fibroblastes humains. Il semble que le nombre de sites est moins élevé pour les cellules qui n'internaliseraient pas la CP. D'autre part, on note une quantité de sites de liaison près de 5 fois moins élevée dans le tissu aortique, comparativement au tissu cardiaque. Enfin, la CP serait internalisée par les cellules endothéliales hépatiques, les fibroblastes et les cellules circulantes autres que les érythrocytes. Il est à noter que l'internalisation de la CP par le récepteur endothélial du foie est le mécanisme par lequel la CP est éliminée de la circulation (Omoto et Tavassoli, 1990).

De tous les récepteurs potentiels de la CP, c'est à ce jour le récepteur érythrocytaire qui demeure le plus documenté. Des études portant sur le récepteur érythrocytaire ont montré que la liaison de la CP n'induit pas son internalisation dans la cellule (Saenko *et al.*, 1990). Cette interaction a la particularité d'être dépendante de la présence d'ions calciques (Ca^{2+}) (Saenko *et al.*, 1988). Il a été proposé que ce récepteur soit une glycoprotéine membranaire abondamment exprimée par les érythrocytes, la glycophorine, une protéine constituée de PAS1 et PAS2 (respectivement, monomère et dimère de protéine) (Saenko *et al.*, 1990). Le monomère PAS1 de la glycophorine possède un poids moléculaire de 30 kDa, alors que celui de la forme dimérique PAS2 est de 60 kDa (Stern et Frieden, 1993). Il semble que la présence de résidus d'acide sialique dans la structure de la CP soit importante pour la

liaison de cette dernière avec les résidus glucidiques de la glycophorine (Saenko *et al.*, 1990). Finalement, une étude par immuno-cytofluorescence avec de la CP marquée d'un fluorophore a montré que la liaison de la CP au récepteur érythrocytaire est saturable, réversible et spécifique (Stern et Frieden, 1990).

Les travaux portant sur le récepteur fibroblastique ont montré que le complexe formé de la CP et de son récepteur à la surface des fibroblastes est internalisé par la cellule (Puchkova *et al.*, 1997). Il s'en suit un largage dans le milieu extracellulaire de deux espèces protéiques, l'une étant la CP dépourvue de ses atomes de cuivre (forme apoCP), l'autre correspondant à la forme native de la CP dénudée en acide sialique. Dû à la perte de ses acides sialiques, la CP n'est plus apte à interagir avec le récepteur à la surface des fibroblastes. Il est intéressant de noter que la CP native ne peut se lier à des cellules HepG2, une lignée cellulaire d'hépatoblastome humain. Toutefois, ces mêmes cellules possèdent à leur surface des récepteurs d'asialoglycoprotéine qui permettent de reconnaître puis de lier la CP sous forme asialo. En somme, la CP se lie au récepteur fibroblastique et/ou endothélial, puis est internalisée cellulièrement. Pendant son transit vésiculaire dans les cellules, les résidus d'acide sialique sont éliminés de la CP qui conserve ses atomes de cuivre. La forme asialoCP résultante qui est sécrétée hors de la cellule pourrait dès lors être prise en charge par les récepteurs des asialoglycoprotéines présents à la surface des hépatocytes (Puchkova *et al.*, 1997). Des études plus approfondies sur le récepteur fibroblastique de la CP ont fait mention qu'il n'est pas entreposé dans le trans-Golgi, mais plutôt apparaît à la surface cellulaire suite à sa maturation (Sasina *et al.*, 1998). De plus, ce récepteur membranaire est, suite à l'internalisation du complexe CP-récepteur, recyclé dans les endosomes. Enfin, l'interaction du récepteur fibroblastique avec la CP requiert un clivage protéolytique spécifique du récepteur, clivage qui peut être inhibé par des inhibiteurs de protéases à sérine (Sasina *et al.*, 1998).

Certaines équipes de recherche ont tenté de purifier et caractériser structuralement les récepteurs de la CP, majoritairement par méthode de chromatographie d'affinité sur de la CP réticulée à de l'agarose (CP-agarose). Il a été constaté de ces études que le poids moléculaire du récepteur varie de 20 à 130 kDa (tableau 1.2). Dans certains cas, le profil électrophorétique montre une bande unique, dans d'autres cas, jusqu'à trois bandes. On ne sait pas si les bandes multiples indiquent l'existence de différents récepteurs, d'un récepteur constitué de différents polypeptides ou d'un polypeptide qui aurait été fragmenté pendant la purification. Il a été montré que le récepteur endothélial du foie a un point isoélectrique (pI) de 5,2 ainsi qu'une teneur en glucides de 3% (Omoto et Tavassoli, 1990).

Récemment, une équipe a rapporté avoir cloné puis caractérisé partiellement un récepteur humain de la CP (Sasina *et al.*, 2000). À partir d'une librairie d'ADNc d'origine placentaire humaine, ils ont effectué un criblage de cette banque au moyen d'un anticorps produit contre le récepteur potentiel de la CP, récepteur purifié par chromatographie sur CP-agarose. Ils ont isolé une séquence de 2300 pb (paires de base) codant vraisemblablement pour un fragment du récepteur humain de la CP. Cette séquence renferme plusieurs régions ayant une forte homologie avec le gène de la CP (Sasina *et al.*, 2000). La traduction et l'analyse informatique de cette séquence révèle un polypeptide présentant plusieurs similitudes avec la CP, notamment la présence de sites de glycosylation ainsi qu'une homologie de la séquence N-terminale. De plus, la position de certains acides aminés (histidines 295 et 343, cystéine 338 et leucine 348) du récepteur est compatible avec la formation d'un domaine de liaison pour le Cu. Or, cette séquence homologue se retrouve dans le domaine 2 de la CP et est impliquée dans les propriétés ferroxidasiques de la protéine. Il a été suggéré que ce récepteur humain de la CP puisse présenter des propriétés ferroxidasiques similaires à celle de la CP. Enfin, cette séquence peptidique décrit une glycoprotéine comportant une région hydrophobe de 16 acides aminés en position C-terminale qui pourrait correspondre à un domaine transmembranaire (Sasina *et al.*, 2000). Il n'y a pas eu de suite à ces études et une séquence ADN complète d'un récepteur placentaire de la CP n'a pas été publiée. Ce récepteur demeure donc non caractérisé.

À l'heure actuelle, il n'y a que spéculation sur l'impact biologique de récepteurs de la CP. Il a été postulé que la liaison de la CP aux récepteurs érythrocytaires, aortiques et cardiaques, pourrait contribuer à protéger les cellules contre le stress oxydatif (Barnes et Frieden, 1984; Stevens *et al.*, 1984). La protection pourrait même être étendue aux monocytes, granulocytes et lymphocytes, considérant que les leucocytes sont capables de produire des anions superoxydes pour fins de défense de l'organisme (Kataoka et Tavassoli, 1985). Il a également été proposé que la présence des récepteurs puissent contribuer à la synthèse de nouvelles protéines en assurant le transport des ions cuivriques, essentiels à la biosynthèse de certaines protéines, de la CP vers les cellules cibles.

En résumé, les études portant sur les récepteurs spécifiques de la CP datent pour la majorité d'au-delà de 20 ans et n'ont pas généré de connaissances précises sur la structure de tels récepteurs. Les résultats d'études de liaison justifient de poursuivre les recherches déjà entreprises visant à améliorer notre compréhension des récepteurs de la CP et de leurs fonctions biologiques.

Tableau 1.1 Résumé d'études de liaison pour la CP.

Matériel biologique	Marquage de la CP	K _d (M)	Quantité de sites	Internalisation de la CP	Référence
Fraction membranaire - tissu aortique	¹²⁵ I-CP	10 ⁻⁸	1,5 pmol/mg prot. memb.	non	(Stevens <i>et al.</i> , 1984)
- tissu cardiaque	¹²⁵ I-CP ⁶⁷ Cu-CP	10 ⁻⁸ 10 ⁻⁷	7,3 pmol/mg prot. memb.	non	(Stevens <i>et al.</i> , 1984) (Orena <i>et al.</i> , 1986)
- tissu de foie	⁶⁷ Cu-CP	10 ⁻⁷			(Orena <i>et al.</i> , 1986)
-tissu de cerveau	⁶⁷ Cu-CP	10 ⁻⁷			(Orena <i>et al.</i> , 1986)
Érythrocytes - humains	¹²⁵ I-CP ¹²⁵ I-CP	5,0 x 10 ⁻⁹ 1,2 x 10 ⁻⁹	144/cellule 246/cellule	non non	(Barnes et Frieden, 1984) (Saenko <i>et al.</i> , 1988, 1990; Saenko et Yaropolov, 1990)
- de lapin	¹²⁵ I-CP	4,0 x 10 ⁻⁹	294/cellule	non	(Barnes et Frieden, 1984)
Monocytes humains	¹²⁵ I-CP	4,8 x 10 ⁻⁷		oui	(Kataoka et Tavassoli, 1985)
Granulocytes humains	¹²⁵ I-CP	1,6 x 10 ⁻⁷		oui	(Kataoka et Tavassoli, 1985)
Lymphocytes humains	¹²⁵ I-CP	2,1 x 10 ⁻⁷		oui	(Kataoka et Tavassoli, 1985)
Cellules endothéliales de foie	¹²⁵ I-CP	10 ⁻⁷	5,7 x 10 ⁵ /cellule	oui	(Kataoka et Tavassoli, 1984)
Fibroblastes humains (lignée HT-1080)	¹²⁵ I-CP	8,0 x 10 ⁻⁸	1,1 x 10 ⁴ /cellule	oui	(Puchkova <i>et al.</i> , 1997)

Tableau 1.2 Résumé d'études de caractérisation structurale de protéines de liaison pour la CP.

Matériel biologique	Méthode d'analyse	Profil électrophorétique de la préparation de protéines de liaison	Référence
Érythrocytes humains	Chromatographie sur CP-agarose	1 bande (60 kDa)	(Barnes et Frieden, 1984)
Érythrocytes humains	Chromatographie sur CP-agarose	3 bandes (130, 67, 50 kDa)	(Puchkova <i>et al.</i> , 1990, 1991)
Érythrocytes de rat	Réticulation croisée Retardement de mobilité sur gel	Résultats peu concluants Résultats peu concluants	(Stern et Frieden, 1993) (Stern et Frieden, 1993)
Vésicules placentaires humaines	Chromatographie sur CP-agarose	3 bandes (90, 45, 40 kDa)	(Hilton <i>et al.</i> , 1995)
Cellules endothéliales du foie	Chromatographie sur CP-agarose	1 bande (35 kDa) ; pI 5,2	(Omoto et Tavassoli, 1989, 1990)
Fibroblastes humains (lignée HT-1080)	IP du récepteur*	3 bandes (67, 47 et 20 kDa)	(Sasina <i>et al.</i> , 1998)

* Immunoprécipitation (IP) à l'aide d'un anticorps produit contre le récepteur qui aurait été cloné.

1.6 Développement du cerveau et neuromigration

1.6.1 Description phénoménologique de la neuromigration

Le développement d'un organisme vivant dépend d'une myriade de facteurs qui sont étroitement régulés. Chez l'humain, le développement se divise en deux grandes étapes, soient l'embryogenèse et le développement fœtal. Le développement embryonnaire, qui permet d'asseoir les bases nécessaires à la formation de l'organisme entier, est subdivisé en plusieurs étapes clés.

Après fécondation de l'ovule, l'étape de la gastrulation lors du développement de l'embryon donne naissance aux trois feuillets germinatifs : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme, ce dernier étant précurseur notamment du système nerveux. La neurulation, une étape suivante, initie toute la formation du système nerveux. La corde dorsale (ou notocorde), qui apparaît dès lors, se présente comme une structure cylindrique composée de cellules mésodermiques qui définit l'axe antéro-postérieur de l'embryon et s'étend sur toute sa longueur (Chizhikov et Millen, 2004). Autour de la troisième semaine de développement, les cellules de l'ectoderme, cellules situées juste au-dessus du mésoderme, vont s'épaissir pour former une colonne épithéliale individualisée nommée la plaque neurale (Wilson et Maden, 2005). Suivant cette induction, la plaque neurale commence à s'invaginer pour former la gouttière neurale, puis se referme en faisant saillie à la surface pour devenir le tube neural. Le tube neural constitue l'ébauche rudimentaire du système nerveux qui assurera le développement de la moelle épinière et du cerveau (Chizhikov et Millen, 2004). Les premiers neurones (cellules du cerveau) se forment à la fin de la quatrième semaine. C'est au cours de l'histogenèse qu'il y a formation des grandes subdivisions de l'encéphale, ce qui donne lieu à la formation de cinq grandes vésicules, le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélencéphale (Rakic, 2006). C'est dans le télencéphale, qui ultimement formera le cortex, qu'une phase de prolifération cellulaire importante générera les neurones et cellules gliales du système nerveux central (SNC). Il s'en suit un processus hautement organisé de déplacement des neurones qui permet à ces derniers de gagner leur emplacement définitif et de terminer leur maturation.

La migration neuronale est un processus qui nécessite l'intervention de plusieurs molécules dont des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidage ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Cette migration est nécessaire à la formation des différentes structures du système nerveux périphérique et celles du cerveau dont le cortex cérébral. Le cortex se forme à partir de millions de cellules migratoires qui se disposent en six couches successives. Les

neurones immatures peuvent migrer de deux façons : radialement, en partance de la zone germinale (aussi désignée zone ventriculaire : ZV) pour atteindre les zones laminales (ZL); et tangentiellement à travers les laminae pour former des couches de neurones denses.

Lors de la migration radiale, les neurones produits dans les zones prolifératives se déplacent de manière orthogonale afin de franchir toute la profondeur du parenchyme (Nadarajah et Parnavelas, 2002). La migration radiale se divise en deux modes de mouvement : 1) par translocation somale ou étirement du corps cellulaire lors des étapes précoces de la corticogénèse, au moment où le mur cérébral est relativement mince; 2) par déplacement le long de fibres gliales pendant les étapes postérieures de la formation corticale, quand le mur cérébral est considérablement plus épais (fig. 1.6A) (Nadarajah et Parnavelas, 2002).

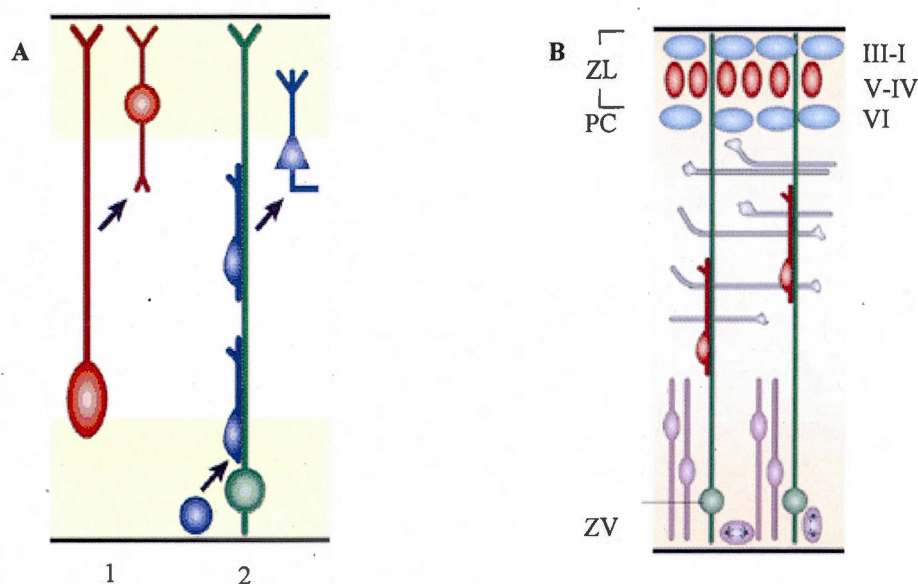


Figure 1.6 Représentation schématique de la migration neuronale. **A** Le mode de migration radiale par translocation somale (1) dans lequel les neurones se déplacent par étirement du corps cellulaire. Le mode de migration radiale par interaction avec, et déplacement sur, des fibres gliales, précurseurs d'astrocytes (2). **B** Élaboration des couches de neurones dans le cortex. Les neurones immatures migrent de la zone ventriculaire (ZV) vers la plaque corticale (PC) pour former les zones laminaires (ZL). Les premiers neurones à atteindre la PC vont constituer la couche VI du cortex. Les couches subséquentes (I à V) vont se former de l'intérieur vers l'extérieur du cortex (inspiré de Nadarajah et Parnavelas, 2002).

Ainsi, les couches profondes étant déjà occupées, les neurones générés plus tardivement migreront plus loin, via les fibres gliales, pour constituer les couches de plus en plus superficielles du cortex. Il est donc assumé que les neurones occupant la même couche ont environ le même âge. Les mécanismes cellulaires sous-jacents à la migration radiale se font en trois étapes; a) l'extension des extrémités des neurones dans le sens du déplacement et l'exploration de l'environnement immédiat en quête de signaux attractifs ou répulsifs; b) la nucléocinétique qui définit le mouvement du noyau vers la zone d'extension; et c) la rétraction de la cellule (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001).

La séquence chronologique menant à la formation des couches du cortex (fig 1.6B) a une importance capitale puisqu'un dérèglement peut entraîner de graves désordres neurologiques (voir section 1.6.3) (Gressens, 2005). Les premiers neurones qui migrent à partir de la ZV sont destinés à l'élaboration d'une couche particulière nommée sous-plaque corticale, qui sera cependant appelée à disparaître plus tard au cours du développement. Les neurones destinés à former les six couches profondes du cortex cérébral traversent ensuite cette sous-plaque et forment une nouvelle couche appelée plaque corticale (PC). Les premières cellules qui atteignent la PC sont celles qui vont former la couche VI du cortex, puis arrivent celles de la couche V, suivies de celles de la couche IV et ainsi de suite de l'intérieur vers l'extérieur du cortex.

Arrivés à destination, les neurones se positionnent, croissent et établissent des contacts synaptiques avec leur cibles afin d'établir des patrons cellulaires propres aux neurones. Cette étape est considérée comme la quatrième de la migration neuronale (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001). À la fin du processus de corticogenèse, la ZV ne constitue plus qu'une couche unique de cellules épendymaires qui limite les ventricules cérébraux (Kubis et Catala, 2005). Des études ont récemment démontré que l'extension des cellules est le fruit d'une réorganisation des microfilaments d'actine, ces derniers étant sous la gouvernance des GTPases de la famille des Rho, de même qu'une réorganisation des microtubules impliqués dans la nucléocinétique (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001; Nadarajah et Parnavelas, 2002). La migration radiale est le mode de migration le plus répandu dans le cortex en développement, et est mieux documentée que la migration tangentielle (Nadarajah et Parnavelas, 2002).

Outre la migration radiale, il existe aussi un mode de migration moins bien connu des neurones : la migration tangentielle, ou horizontale, qui serait de nature neurophilique. Les neurones se déplacent de façon parallèle à la surface germinative, le long d'axones ou d'autres neurones, et franchissent ainsi de grandes distances (Nadarajah et Parnavelas, 2002). Certains neurones migrant de manière tangentielle

doivent franchir plusieurs centaines de micromètres dans une région déjà dense en cellules. Il subsiste encore bon nombre d'interrogations quant aux substrats employés par ces neurones pour assurer et guider leur déplacement dans le cortex, mais il semble clair que leur migration ne dépend pas de la présence de cellules gliales (Nadarajah et Parnavelas, 2002).

1.6.2 Quelques modulateurs de la neuromigration

Comme évoqué précédemment, la neuromigration nécessite l'intervention de différentes molécules. Une revue de la littérature permet de relever quelques modulateurs importants de la neuromigration, à commencer par la reeline. La reeline est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire composée d'environ 3500 acides aminés et dont le poids moléculaire est approximativement de 400 kDa (Lacor *et al.*, 2000). La structure de la reeline (fig. 1.7) est constituée d'une séquence N-terminale ayant une forte homologie de structure avec la protéine F-spondine, puis de huit répétitions d'un même domaine (Fatemi, 2005; Panteri *et al.*, 2006). *In vivo*, la reeline est clivée à deux sites préférentiels, localisés après les domaines 2 et 6, générant deux principaux fragments de 300 et 180 kDa à partir de la terminaison NH₂ native (Jossin *et al.*, 2003). La reeline est exprimée et sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius, localisées dans la zone marginale du cortex cérébral (Zhao *et al.*, 2004). Elle est également exprimée dans le cervelet par une sous-population de neurones glutamatergiques situés dans les couches granulaires (Lacor *et al.*, 2000; Scotti et Herrmann, 2002).

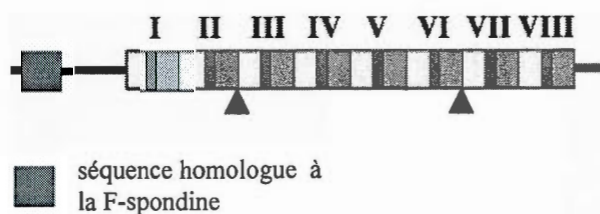


Figure 1.7 Organisation structurale de la reeline. La structure de la reeline est composée d'une séquence homologue à la protéine F-spondine en position N-terminale, suivie des huit domaines de la protéine. Deux sites de clivage (▲) préférentiels sont localisés après les domaines 2 et 6 (inspiré de Panteri *et al.*, 2006). L'anticorps G10 utilisé dans le présent travail est dirigé contre un épitope de la région N-terminale et reconnaît la forme native de la reeline (400 kDa) ainsi que les formes de 180 kDa (générée par le clivage après le domaine 2) et de 300 kDa (générée par le clivage après le domaine 6).

La reeline joue un rôle important dans la migration neuronale et la croissance des neurites pour le développement des structures laminaires du cortex, de l'hippocampe et du cervelet. Différents modes d'action ont été proposés pour expliquer son rôle de modulateur de la neuromigration mais le mécanisme complet n'est pas connu. La reeline est une protéase à sérine qui, de par son activité protéolytique, permet le clivage de molécules de la matrice extracellulaire et/ou la digestion de la matrice extracellulaire, ce qui permet le mouvement des neurones pour la migration neuronale (Kim *et al.*, 2002; Maurin *et al.*, 2004). La reeline est connue pour interagir spécifiquement avec des récepteurs présents à la surface neuronale (e.g. $\alpha_3\beta_1$ -intégrine, VLDL_R : « very low density lipoprotein receptor », et ApoER2 : « apolipoprotein E receptor 2 »), ce qui induit une cascade d'activation moléculaire impliquée dans l'organisation des neurones (Maurin *et al.*, 2004; Fatemi *et al.*, 2005). Certains auteurs rapportent que la reeline pourrait agir comme signal d'arrêt de la migration des neurones le long des fibres (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001; Hack *et al.*, 2002). Ce mécanisme demeure toutefois controversé et demande à être davantage étudié.

Le rôle de première instance de la reeline dans l'organisation neuronale du cortex a été mis en évidence par un modèle de souris *reeler*, i.e. présentant une mutation autosomale récessive sur le gène codant pour la reeline, ce qui rend la protéine inopérante (Fatemi *et al.*, 2005). L'examen histologique du cortex des souris *reeler* montre une défaillance dans l'organisation laminaire corticale, un positionnement anormal des neurones, une mauvaise orientation des fibres nerveuses et une hypoplasie cérébrale (fig. 1.8) (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001; Fatemi *et al.*, 2005). Plusieurs études ont montré qu'une désorganisation neuronale est étroitement associée à l'émergence de maladies neuronales telles la schizophrénie, l'autisme et la lissencéphalie (Guidotti *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000). En accord avec cette association, une diminution de l'expression de la reeline est observée dans le cerveau des patients souffrant de schizophrénie et d'autisme (Fatemi, 2005).

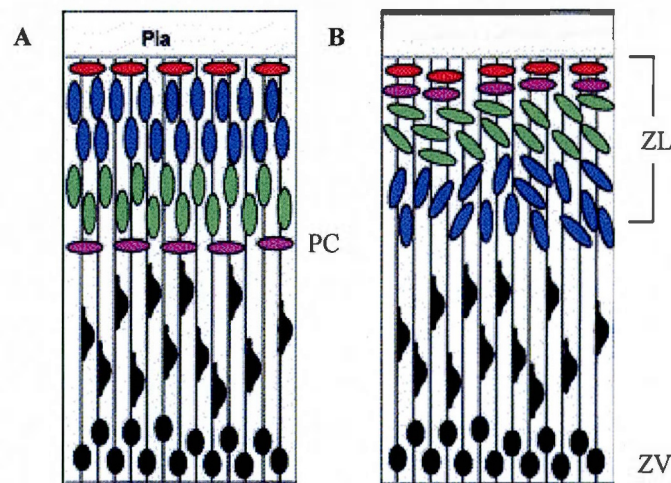


Figure 1.8 Schéma de l'organisation des couches neuronales du cortex. A Phénotype normal. Les neurones migrent et forment des couches ordonnées dans la ZL. B Phénotype *reeler*. Les couches neuronales de la ZL sont désorganisées et il y a absence de la PC. (inspirée de Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001)

D'autres protéases à sérine ont été rapportées dans la littérature comme ayant un impact sur la migration neuronale. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) en est un exemple. Il est principalement synthétisé dans le cervelet en développement. Une fois sécrété, il convertit la pro-enzyme plasminogène en sa forme active, la plasmine. Le tPA est reconnu pour agir sur la croissance des neurites, ainsi que sur la migration neuronale subséquente (Tsirka, 2002). Il a été démontré au moyen d'un modèle de souris dont le gène du tPA a été supprimé ($tPA^{-/-}$), que la migration neuronale est retardée à près de 50%, dans un temps donné, comparativement aux souris normales (Seeds *et al.*, 1999). Cela suggère que le tPA facilite la migration neuronale et diminue la possibilité d'altérer les interactions synaptiques (Seeds *et al.*, 1999).

D'autres classes de protéases sont susceptibles d'agir dans la migration neuronale. C'est le cas de certaines métalloprotéinases de la matrice (MMP), particulièrement celles appartenant à la famille des endopeptidases dépendantes du Zn^{2+} , présentes tant dans la matrice extracellulaire, sous forme soluble, qu'à la surface des cellules. Les MMP régulent ou dégradent par clivage protéolytique bon nombre de protéines de la matrice extracellulaire, de cytokines et de molécules d'adhésion cellulaire (e.g. cadhérines, intégrines), ainsi qu'une variété de récepteurs membranaires. Le système des MMPs et de leurs inhibiteurs tissulaires TIMP (« tissue inhibitors of metalloproteinases ») est impliqué dans divers

processus telles la neuroinflammation, la rupture de la barrière hématoencéphalite, mais aussi au niveau de la croissance axonale et la plasticité neuronale (Khrestchatisky *et al.*, 2003). Il (i.e. le système MMP/TIMP) s'avère même être un outil prometteur dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques pour contrer les effets de maladies neurodégénératives (Khrestchatisky *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2004).

1.7 Le modèle de carcinome embryonnaire murin P19

1.7.1 Origine et différenciation neuronale

La compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent le développement embryonnaire demeure une question contemporaine des plus importantes posée à la biochimie moléculaire et cellulaire. Autant la différenciation cellulaire que le développement des structures complexes d'un organisme dépendent de l'intercommunication et de la coordination de diverses voies de signalisation cellulaires (Ulrich et Majumder, 2006).

Le modèle cellulaire P19, développé initialement par le Dr McBurney, constitue jusqu'à ce jour un modèle solidement établi de cellules souches embryonnaires. Les cellules P19 sont des cellules de carcinome embryonnaire isolées d'un tératocarcinome formé par la transplantation, sur un testicule de souris, d'un embryon de souris et ce, au jour 7,5 de son développement, soit avant qu'il y ait initiation de la différenciation cellulaire et la séparation des couches germinales (McBurney, 1993). Les cellules P19 sont non-différenciées, prolifèrent rapidement et indéfiniment, et ont un caryotype euploïde mâle normal qui leur confère une stabilité génétique (McBurney, 1993). À l'image des cellules souches embryonnaires normales, elles ont la capacité ou le potentiel de donner naissance à tous les types cellulaires et sont donc dites pluripotentes (Rudnicki et Mc Burney, 1987). Les cellules P19 sont faciles à manipuler génétiquement de même que biochimiquement (MacPherson et Mc Burney, 1995; Ulrich et Majumder, 2006). Lorsqu'elles sont greffées à un embryon ordinaire qui se développe *in vivo* en milieu utérin, elles contribuent à la formation de tous les tissus de l'embryon, ce qui signifie que dans un environnement approprié, elles sont développementalement totipotentes (McBurney, 1993).

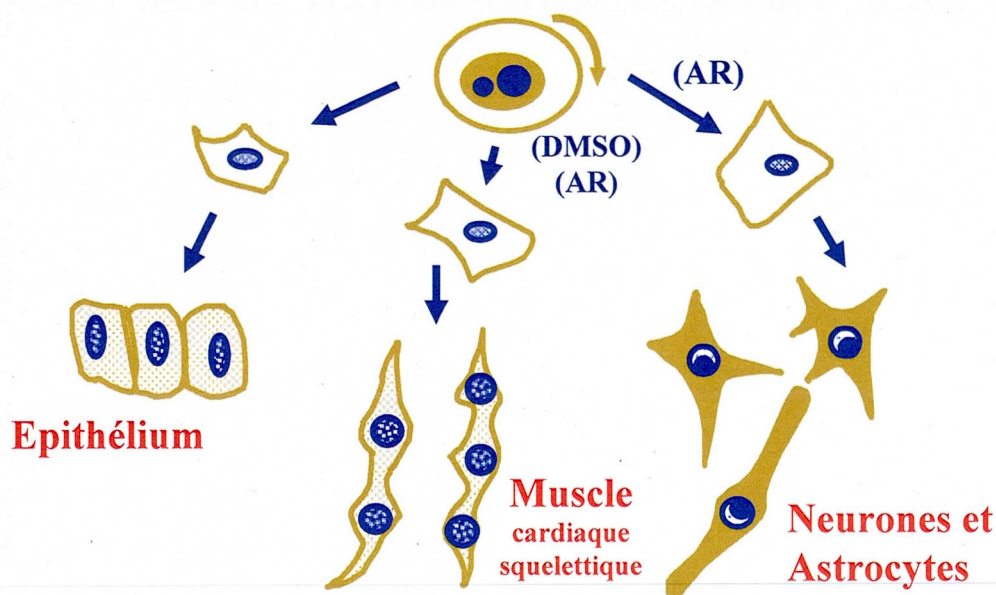


Figure 1.9 Le modèle cellulaire P19. Les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19 ressemblent aux cellules souches embryonnaires : elles sont indifférenciées, prolifératives et pluripotentes. Elles peuvent se différencier en dérivés cellulaires des trois feuillets germinatifs *in vivo* et *in vitro*. (AR, acide rétinoïque; DMSO, diméthylsulfoxyde) (schéma adapté de Rudnicki et Mc Burney, 1987)

In vitro, on ne connaît pas les conditions générant les divers types cellulaires de l'organisme. Cependant, certains inducteurs de différenciation cellulaire ont été identifiés (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982; McBurney *et al.*, 1982). À titre d'exemple, les cellules P19 peuvent être différenciées en cellules de type épithélial, musculaire (cardiaque et squelettique) ou neuronal (fig. 1.9) (MacPherson et Mc Burney, 1995). En présence du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou d'une faible concentration d'acide rétinoïque (AR) (10^{-8} M), les cellules P19 ont la capacité de se différencier en cellules musculaires de type cardiaque (cellules battantes) comme squelettique (van der Heyden et Defize, 2003). Il a récemment été démontré que l'ocytocine, une hormone impliquée dans la contraction de l'utérus lors de l'accouchement ainsi que de celle des canaux lactifères durant la lactation, peut induire les cellules P19 à se différencier en cardiomyocytes (Paquin *et al.*, 2002). D'autre part, lorsque les cellules P19 sont mises en présence de hautes concentrations d'AR (10^{-6} M), elles se différencient en dérivés neuroectodermiques, tels que des neurones, des fibroblastes, des astrocytes, des cellules microgliales et des oligodendrocytes (Chiu *et al.*, 1995). Il est à noter que dans les jours suivant l'exposition à l'AR, les cultures contiennent majoritairement des neurones et des fibroblastes. En absence de sérum, il y a très

peu de fibroblastes et les neurones prédominent à près de 95%. La neurodifférenciation peut être facilement obtenue et elle est reproductible, conséquence d'une division cellulaire relativement synchronisée des cellules P19. Les neurones P19 permettent de suivre l'acquisition de caractéristiques moléculaires, morphologiques et physiologiques spécifiques aux neurones normaux du SNC (Ulrich et Majumder, 2006).

Aux jours 5-6 de la différenciation, les neurones nouvellement obtenus présentent plusieurs phénotypes caractéristiques de ceux que l'on retrouve dans les populations neuronales normales du SNC. En plus d'être irréversiblement post-mitotiques, ils expriment bon nombre de marqueurs neuronaux tels que l'énolase spécifique aux neurones, la β_{III} -tubuline, les neurofilaments, les protéines MAP-2 (« microtubule-associated protein ») et *tau* qui sont associées aux microtubules, de même que plusieurs autres antigènes spécifiques (Chiu *et al.*, 1995; MacPherson et Mc Burney, 1995).

Les cellules nouvellement différenciées acquièrent les traits de neurones matures de manière graduelle et programmée. Conséquemment, ces cellules constituent un excellent modèle pour étudier le développement neuronal, incluant la différenciation et la maturation. Quelques jours suivant la différenciation sous induction avec l'AR, soit du J5 au J10, une forte proportion de neurones vont synthétiser une grande variété de neurotransmetteurs tels que l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le glutamate et l'acétylcholine, des neuropeptides comme la somatostatine et le neuropeptide Y et des enzymes nécessaires à la biosynthèse de neurotransmetteurs (e.g. glutamate-décarboxylase, tyrosine-hydroxylase, et choline-acétyltransférase) et neuropeptides (e.g. protéine-convertase-2) (Jeannotte *et al.*, 1997; Ulrich et Majumder, 2006). Des protéines impliquées dans le fonctionnement des synapses sont également produites par les neurones comme les protéines du cytosquelette, des vésicules synaptiques et des terminaisons axonales (Parnas et Linial, 1995), des récepteurs dont ceux du GABA (Reynolds *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 1996) et du glutamate (MacPherson *et al.*, 1997). Ultérieurement, les neurones développent la capacité de larguer des neurotransmetteurs et des neuropeptides sous stimulation (Parnas et Linial, 1995; Cadet et Paquin, 2000). Le profil en neurotransmetteurs et neuropeptides des neurones P19 indique la génération de populations neuronales mixtes qui ressemblent à celles de l'hippocampe, du striatum et du néocortex (MacPherson *et al.*, 1997; Cadet et Paquin, 2000).

Les neurones P19 vont poursuivre leur développement et acquérir une maturation électrophysiologique au niveau de leurs membranes, assurant une bonne acquisition des propriétés électriques des neurones matures (Cheun et Yeh, 1991; Morassutti *et al.*, 1994; Magnuson *et al.*,

1995). Il a été démontré par la technique du « patch-clamp » sur des neurones P19 nouvellement différenciés qu'ils sont caractérisés d'abord par un courant dépendant du voltage entrant, attribuable aux ions Na^+ , suivi d'un courant rectificateur sortant attribuable aux ions K^+ . Ceci n'est pas observé sur les cellules P19 non-différenciées (Cheun et Yeh, 1991). Les neurones montrent de grandes dépolarisations en réponse à des stimuli électriques 14 jours suivant le traitement à l'AR et sont aptes à générer des potentiels d'action matures ayant des amplitudes d'environ 80 à 100 mV après 28 jours de culture (MacPherson et Mc Burney, 1995).

Du point de vue morphologique, les neurones P19 ont l'aspect de petits corps cellulaires qui projettent plusieurs extensions correspondant à des neurites (fig 1.10B). Il est possible d'observer une morphologie semblable dans les cultures neuronales primaires. Les prolongements neuritiques des cellules P19, dépendamment de leur stade de maturité, se multiplient, s'étendent, se complexifient, se différencient en axones et en dendrites et sont respectivement séparés en compartiments axonaux et dendritiques (Magnuson *et al.*, 1995; Finley *et al.*, 1996). Il s'en suit la formation de synapses qui sont morphologiquement matures et établissent un réseau synaptique fonctionnel avec les cellules environnantes (McBurney *et al.*, 1988; Magnuson *et al.*, 1995; Finley *et al.*, 1996)

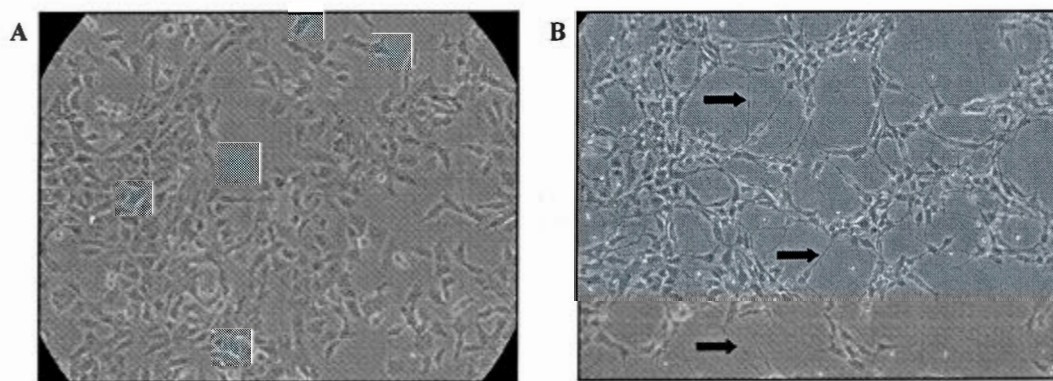


Figure 1.10 Micrographies de cellules P19. A Cellules non différenciées, **B** Neurones (les flèches pointent les neurites). Grossissement 100X.

Finalement, la densité des neurones P19 en culture est un facteur susceptible d'influencer le phénotype de neurotransmission des neurones. Il a été démontré qu'une augmentation de la densité cellulaire accélère la maturation des neurones P19 et favorise un phénotype glutamatergique (Parnas et Linial, 1997). Les manifestations de cette augmentation sont perceptibles notamment par une augmentation de la sécrétion de ^3H -aspartate après une stimulation avec du KCl, par une élévation de l'expression protéique spécifique aux synapses, par une stimulation de la croissance des projections neuritiques ainsi que par une ségrégation précoce des dendrites et des axones (Parnas et Linial, 1997). À l'opposé, une diminution de la densité cellulaire diminue le phénotype glutamatergique au profit d'un phénotype cholinergique.

1.7.2 Action neuroagrégate de la CP

Récemment, les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont démontré que la CP peut induire l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules P19 *in vitro* (Maltais *et al.*, 2003). Cette action soulève la possibilité d'un rôle de la CP dans l'organisation architecturale du système nerveux en développement. L'effet neuroagrégaire induit par la CP a été partiellement caractérisé. Les neurones incubés en présence de CP forment, dans un délai de 24 à 48 h, des agrégats compacts qui adhèrent au support de culture, alors que les neurones non traités forment un réseau en monocouche (fig. 1.11).

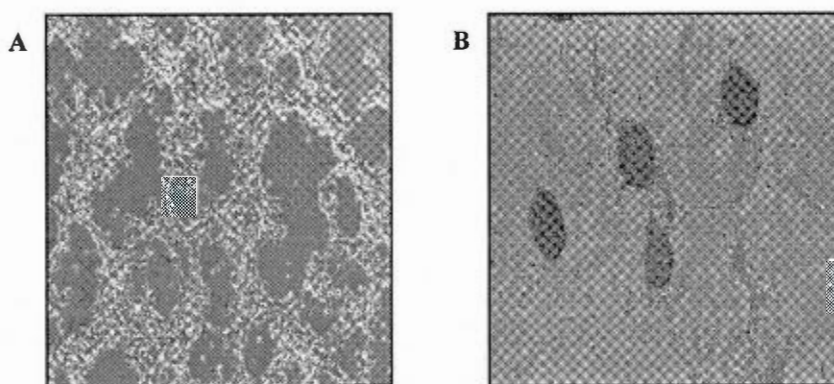


Figure 1.11 Agrégation des neurones P19 induite par la CP. A Neurones P19 en absence de CP. B Neurones P19 traités avec la CP pendant 24 h (Maltais *et al.*, 2003).

Il a été rapporté que l'agrégation des neurones est dépendante de la concentration en CP et est saturable au-delà de 3,8 μ M CP. Des études de liaison avec de la CP marquée à la digoxigénine (CP-DIG), une petite molécule pour laquelle il existe un anticorps spécifique, ont démontré que la CP se lie aux neurones mais non aux cellules indifférenciées. L'interaction entre la CP-DIG et les neurones peut être déplacée par ajout d'un excès de CP non marquée, ce qui suggère que l'interaction entre les neurones et la CP pourrait être de type ligand-récepteur (Maltais *et al.*, 2003). La neuroagrégation induite par la CP ne provoque pas la nécrose ou l'apoptose. L'effet neuroagréatif de la CP est indépendant du type de matrice utilisé pour la culture des cellules. La substitution de la CP native par d'autres protéines à cuivre (e.g. la laccase, et l'amine-oxidase sérique), la CP dénaturée par la chaleur, l'albumine, des sels de cuivre ou encore le complexe $\text{His}_2\text{-Cu}$, n'a pas provoqué l'agrégation des neurones. Le présent projet s'imbrique donc dans la poursuite des travaux entamés au laboratoire, en vue de mieux comprendre ce phénomène de neuroagrégation.

1.8 Hypothèse de recherche et objectifs

En considérant le support que la CP pourrait apporter aux fonctions neuronales, ainsi que son expression dans le cerveau, l'hypothèse suivante fut émise comme base de cette étude :

« L'agrégation induite par la CP sur les neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19 serait, in vitro, un reflet de la capacité de la CP de moduler la migration neuronale durant le développement du cerveau. Ainsi, les nouveaux neurones pourraient se déplacer en culture, en présence de la CP, parce qu'ils auraient des sites de liaison pour la CP à leur surface; ces sites de liaison correspondraient à des récepteurs ou des protéines acceptrices de la CP. Les nouveaux neurones pourraient se déplacer en culture par des mécanismes impliquant la reeline et/ou d'autres protéases. »

L'hypothèse a été éprouvée selon les objectifs suivants :

1. Produire un matériel chromatographique à base de CP immobilisée pour l'isolation de protéines de liaison de la CP.
2. Évaluer s'il est possible de retenir des protéines d'extraits d'homogénats de cerveau avec ce type de support.
3. Déterminer si des inhibiteurs de protéases affectent l'action agrégative de la CP sur des neurones P19 nouvellement différenciés.
4. Déterminer si les neurones P19 expriment la reeline et si la CP et des inhibiteurs de protéases ont un effet sur l'expression protéique de la reeline.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Purification et dosage de la CP

2.1.1 Purification de la CP à partir de sérum bovin

La purification de la CP à partir de sérum bovin est effectuée selon la procédure élaborée par Mateescu et *al.* (1999) qui consiste d'abord à une précipitation fractionnée du sérum avec le sulfate d'ammonium suivie d'une étape de chromatographie sur aminoéthyl(AE)-agarose. De façon plus explicite, à dix volumes de sang bovin (collecté de bœuf québécois à la Boucherie - abattoir Tarte Enr., Marieville, Québec, Canada) a été additionné un volume d'une solution anticoagulante de citrate de sodium 2,5% (85 mM citrate trisodique, 71 mM acide citrique et 111 mM dextrose, pH 4,5). Le sérum a été recouvré après une série de centrifugations à 3000 g durant 20 min à 4°C. Le sérum a été par la suite incubé avec du sulfate d'ammonium (Sigma-Aldrich) à 35% saturation (209 g par litre de sérum) pendant 2 h à 4°C sous agitation douce. Le mélange a ensuite été centrifugé à 10 000 g durant 20 min à 4°C, puis la fraction soluble a été menée à 55% saturation en sulfate d'ammonium par l'ajout de 129 g du sel par litre de sérum, incubée pendant 30 min à 4°C sous agitation douce pour être finalement centrifugée à nouveau à 10 000g durant 20 min à 4°C. Afin d'éliminer le sulfate d'ammonium, le culot résultant a été resuspendu dans du tampon phosphate de potassium (KPi) 10 mM, pH 7,2, dialysé contre 20 L de ce tampon sur une période de 20 h avec deux changements de tampon, puis centrifugé à 10 000 g durant 20 min à 4°C. Le surnageant a été récupéré et déposé sur AE-agarose (colonne de 30 mm de diamètre contenant 35 ml de gel préalablement équilibré avec du tampon KPi 10 mM à pH 7,2; Aouffen et *al.*, 2001) et ce, à l'aide d'une pompe péristaltique Watson-Marlow 202 (Watson-Marlow Limited, Falmouth, Cornwall, Angleterre) en circuit fermé à raison d'un débit de 120 mL/h. Par la suite, la colonne a été lavée respectivement avec dix volumes de tampon 10 mM KPi à pH 7,2 suivi de cinq volumes de tampon 20 mM KPi pH 7,2 et trois volumes de tampon 30 mM KPi pH 7,2. Des fractions chromatographiques de 1 mL ont été récupérées à l'aide d'un collecteur de fraction Pharmacia LKB-Redi FRAC-100 (Amersham Pharmacia Biosciences, Oakville, Ontario, Canada). La CP retenue sur la colonne est visible par sa coloration bleue caractéristique. La protéine est éluée par l'ajout de tampon KPi 200 mM à pH 7,2. Les fractions teintées de bleu de l'étape d'élution ont été combinées, puis la solution finale a été diluée deux fois, afin de réduire la teneur en KPi, et finalement concentrée en protéine, par centrifugation sur filtre Amicon (Millipore, Nepean, Ontario, Canada).

La pureté de la solution de CP obtenue après la chromatographie a ensuite été évaluée par la mesure du rapport de densité optique à 610/280 nm, l'absorbance à 610 nm étant attribuée au cuivre de type I alors que celle à 280 nm étant due au contenu en protéine. Des valeurs égales ou supérieures à 0,04 ont été obtenues, indiquant que la solution de CP est pure. Enfin, la CP a été dosée pour son contenu en protéines par la méthode microBCA et sa pureté a été confirmée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) en utilisant un gel de 10%.

2.1.2 Dosage de l'activité oxydasique de la CP

L'activité oxydasique a été déterminée en suivant l'oxydation du para-phénylènediamine (*p*PD) par spectrophotométrie à 560 nm. Le dosage a été effectué sur microplaque de 96 puits (Sarstedt) et lu à l'aide d'un lecteur de microplaque (THERMO max™; Molecular devices, Menlo Park, Californie, USA). Le milieu réactionnel contient, en concentration finale, 10 mM de *p*PD, 250 mM de tampon acétate de sodium (NaAc) à pH 5,2, 5 mM d'EDTA et de la CP. Le milieu réactionnel a été incubé durant 45 à 90 min selon le cas, à température ambiante et ce, à l'abri de la lumière. Des lectures spectrophotométriques à intervalles réguliers ont été prises durant l'incubation. Le dosage oxydasique a été optimisé de telle sorte que le milieu réactionnel se compose désormais de 10 mM de *p*PD, 50 mM de tampon KPi à pH 7,0 et de CP. Une unité d'activité enzymatique (1U) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour générer une augmentation de la valeur de densité optique de 1 mDO/min à 560 nm.

2.2 Chromatographie d'extraits biologiques sur CP immobilisée

2.2.1 Immobilisation de la CP sur gel d'agarose

Le Sepharose-4B activé au bromure de cyanogène (CNBr-Sepharose®) (Amersham Pharmacia Biosciences) permet d'immobiliser une protéine par couplage de groupements amines de la protéine. Précisément, 1 g de billes CNBr-Sepharose a été gonflé et activé dans 20 mL de 1 mM HCl pendant 15 min (1 g de billes donne un volume final approximatif de 4 ml de gel hydraté). Les billes ont été lavées abondamment avec la même solution puis avec de l'eau nanopure et finalement avec un tampon de couplage 100 mM KHCO₃ à pH 8,3. La CP diluée dans le tampon de couplage a été ajoutée aux billes de CNBr-Sepharose activées et le tout incubé 1 h à température ambiante sous agitation douce, puis 18 h à 4°C. Deux gels ont été confectionnés, l'un utilisant 5 mg de CP/g de billes et l'autre, 30 mg de

CP/g de billes. Le surnageant de l'étape de couplage a été retiré puis conservé pour en vérifier ultérieurement la teneur en protéine. Les billes ont été lavées avec un excès de tampon 100 mM KHCO_3 , pH 8,3 et les sites résiduels actifs ont été bloqués avec une solution de 50 mM Tris-HCl, pH 8,3. Les billes ont ensuite été lavées avec un excès d'eau nanopure suivi d'une solution de 100 mM KCl et équilibrées dans du tampon de Hank balancé en sels (HBSS : 0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na_2HPO_4 , 0,44 mM KH_2PO_4 , 1,3 mM CaCl_2 , 1,0 mM MgSO_4 , 4,9 mM MgCl_2 , 4,2 mM NaHCO_3 et 0,05 M D-glucose, pH 7,4) supplémenté avec 0,1% v/v de Tween-20 (HBSS-Tw 0,1%).

2.2.2 Préparation d'extraits de protéines membranaires d'érythrocytes

Du sang de bœuf prélevé tel que décrit pour la purification de la CP a été centrifugé à 1000 g durant 5 min afin de sédimenter les érythrocytes. Le surnageant a été retiré puis le culot de cellules a été lavé avec deux volumes de PBS froid et centrifugé à 1000 g durant 5 min. Après avoir répété ces étapes quelques fois pour éliminer totalement la fraction plasmatique, les érythrocytes ont été suspendus dans deux volumes d'un tampon isotonique de 5 mM HEPES-Tris (Sigma-Aldrich) pH 7,5, supplémenté d'un mélange d'inhibiteurs de protéases I (Sigma-Aldrich), dans un tube de verre de 15 ml conçu pour un homogénéisateur (potter). La lyse et les étapes subséquentes ont été faites à 4°C. Les érythrocytes frais ont ainsi été broyés au potter, à raison de six passages lents à 1000 rpm, puis l'homogénat a été centrifugé à 1000 g durant 2 min pour précipiter les cellules non brisées. Le surnageant résultant a été dilué avec un volume égal de tampon 5 mM HEPES-Tris pH 7,5, afin de faciliter l'élimination de l'hémoglobine restante ultérieurement. La préparation a été centrifugée à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman L8-M à 55000 g durant 1 h, dans des tubes à ultracentrifugation 16x76 mm conçus pour un rotor de type 70.1Ti. Le culot résultant, composé des membranes érythrocytaires, a été resuspendu dans un tampon 20 mM KPi, 0,15 M KCl, pH 7,4, puis du Triton X-100 a été ajouté à concentration finale de 1% v/v afin de solubiliser les membranes. La préparation a été incubée durant 30 min avec agitation douce sur vortex à intervalle régulier de 5 min. La préparation a été diluée avec 9 volumes de tampon 20 mM KPi pH 7,4 pour abaisser la concentration finale de Triton X-100 à 0,1% v/v, transférée dans des tubes 7x20 mm conçus pour ultracentrifugeuse (Beckman), puis ultracentrifugée à 100 000 g durant 30 min au moyen d'un rotor de type 42.2Ti (Beckman). La fraction soluble, correspondant à l'extrait protéique membranaire, a été récupérée soigneusement et analysée directement (dosage micro-Bradford, chromatographie sur CP-agarose, SDS-PAGE) ou congelée à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.2.3 Préparation d'extraits de protéines totales de cerveau

Les cerveaux ont été prélevés de rats adultes et nouveau-nés (3-4 jours) Sprague-Dawley (Charles River, St-Constant, Québec, Canada). Les rats adultes ont été euthanasiés par une exposition à un mélange de CO₂-O₂ dans un rapport 2:1 puis dans 100% CO₂, alors que les rats nouveau-nés ont été mis à mort par décapitation, conformément aux normes établies par le *Comité institutionnel pour la protection des animaux* (CIPA). Les cerveaux ont été collectés rapidement, lavés dans une solution de PBS froid puis conservés sur glace. Toutes les étapes subséquentes ont été faites à 4°C. Les cerveaux (≈2,0 à 2,5 g /cerveau) ont été réduits en petits morceaux puis déposés dans un tube en verre d'une capacité de 15 mL, conçu pour un homogénéisateur (potter), avec 10 ml de tampon 20 mM KPi pH 7,4 froid ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cocktail I de Sigma-Aldrich). Les morceaux de tissus ont ainsi été broyés au potter (B.Braun Melsungen AG, Deutschland, Allemagne), à raison de six à huit passages lents à 1000 rpm, suivi de l'ajout de détergent non-ionique Triton X-100 à une concentration finale de 1% v/v. Après deux autres passages au potter, l'homogénat a été transféré dans un tube de 15 ml (Sarstedt) puis incubé durant 1 h sous agitation douce pour permettre la solubilisation des membranes. L'homogénat a été centrifugé à 4200 g durant 10 min à l'aide d'une centrifugeuse Beckman Avanti™J-25 (Beckman) munie d'un rotor J-25 (Beckman) et ce, dans le but d'éliminer les gros débris. Le surnageant résultant a été à nouveau centrifugé à l'aide d'une ultracentrifugeuse Beckman L8-M (Beckman) à 100 000 g durant 1 h, dans des tubes à ultracentrifugation 16x76 mm (Beckman) conçus pour un rotor de type 70.1Ti (Beckman). Par la suite, le surnageant a été récupéré soigneusement puis dilué 1:9 avec du tampon 20 mM KPi pH 7,4 afin d'abaisser la concentration finale de Triton X-100 à 0,1% v/v. Le surnageant final a été analysé directement (dosage micro-Bradford, chromatographie sur CP-agarose, analyse SDS-PAGE) ou congelé à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.2.4 Chromatographie d'extraits de protéines sur CP-agarose

Des échantillons frais d'extraits de protéines (9 mg de protéines pour les érythrocytes bovins, 6,6 mg de protéines pour les cerveaux de rats adultes ou 2 mg de protéines de lysat neuronal P19; voir section 2.3.5) ont été déposés sur une colonne (diamètre de 10 mm) de CP-agarose (500 µL de gel à 7,44 mg de CP/ml de gel) préalablement conditionnée. Le conditionnement a été effectué en appliquant dix volumes de tampon 20 mM KPi, 1% Triton X-100 à pH 7,4 (Sigma-Aldrich), suivi de dix volumes de tampon 20 mM KPi, 0,1% Triton X-100, pH 7,4. L'extrait protéique préparé dans un tampon 20 mM KPi, 0,1% Triton X-100, pH 7,4, a été appliqué sur la colonne à l'aide d'une pompe

péristaltique Pharmacia LKB Pump P-1 (Amersham Pharmacia Biosciences), à raison d'un débit de 0,1 mL/min. Par la suite, la colonne de CP-agarose a été lavée avec dix volumes de tampon 10 mM KPi, 0,1% Tween-20 à pH 7,4. La désorption a été réalisée à l'aide d'un gradient salin croissant mais discontinu : dix volumes de tampon 20 mM KPi, pH 7,4, 0,1% Tween-20, contenant 0,15M KCl, dix volumes du même tampon contenant 0,5M KCl et finalement dix volumes de tampon contenant 3,0M KCl. Dans le cas de l'extrait de cerveaux, une étape chromatographique sur AE-agarose (500 µL de gel, diamètre de la colonne de 10 mm) a précédé la chromatographie sur CP-agarose pour dépler l'échantillon de toute CP endogène. L'extrait a été déposé sur AE-agarose à un débit de 0,5 mL/min et la fraction non retenue a ensuite été appliquée sur CP-agarose. Le matériel adsorbé sur AE-agarose a été élué pour analyse. Après lavage avec dix volumes de tampon 10 mM KPi, 0,1% Tween-20, pH 7,4, la colonne AE-agarose a été éluée avec dix volumes de tampon 200 mM KPi à pH 7,4. Dans tous les cas, les fractions chromatographiques de 200 µL ont été récoltées par gravité à l'aide d'un collecteur de fractions Pharmacia LKB · Redi FRAC-100. Les fractions et des aliquotes des diverses étapes chromatographiques ont été analysés directement (dosage micro-Bradford, analyse SDS-PAGE, immunobuvardage) ou congelés à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.3 Différenciation neuronale et traitements des cellules P19

2.3.1 Culture des cellules P19 indifférenciées

Les cellules P19 originalement obtenues du Dr M.W. Mc Burney (Université d'Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada) ont été cultivées selon le protocole décrit par Jeannotte *et al.* (1997) comportant quelques modifications. Toutes les solutions servant à la culture cellulaire sont utilisées à 37°C, stérilement. Les cellules sont cultivées et croissent à 37°C, dans une atmosphère de 5% CO₂. Elles sont maintenues dans leur état non différencié lorsque cultivées en monocouche dans un milieu complet constitué de α-MEM (« α-Modified Eagle Essential Minimum », Gibco-BRL) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (FBS : Gibco-BRL, Burlington, Ontario, Canada), 2,5 U/mL de pénicilline et 2,5 µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada). Les passages cellulaires ont été effectués tous les deux jours, soit lorsque les cellules sont à confluence. Pour la trypsination des cellules, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées deux fois avec du tampon phosphate salin (PBS : 0,8% p/v NaCl, 0,02% p/v KCl, 0,02% KH₂PO₄, 0,115% p/v Na₂HPO₄, pH 7,3), puis incubées avec une solution de 0,025% p/v trypsine (Sigma-Aldrich), contenant 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) dans du PBS (T-EDTA), jusqu'au décollement complet des cellules. L'enzyme a été neutralisée par l'ajout d'un volume égal de milieu complet. Par la suite, les cellules ont été

individualisées par pipettages puis comptées à l'aide d'un hémacytomètre (Fisher Scientific, Montréal, Québec, Canada) sous un microscope optique à contraste de phase (model TMS-F, Nikon, Japon). Les cellules ont été ensemencées sur pétri tissulaire (Sarstedt, Newton, Caroline du Nord, U.S.A.) de 100 mm de diamètre, à une densité de 1 million de cellules par 10 mL de milieu complet.

2.3.2 Différenciation neuronale des cellules P19

La figure 2.1 résume les étapes du protocole de la différenciation neuronale. La différenciation neuronale des cellules P19 est effectuée sur une période de six à huit jours selon les modifications apportées par Jeannotte *et al.* (1997) à la procédure originelle de Rudnicki et McBurney (1987). Au jour zéro (J0), les cellules P19 ont été ensemencées dans un pétri bactériologique (Sarstedt) de 100 mm de diamètre à une densité de 1,5 million dans 10 mL de milieu α -MEM de différenciation (α -MEM contenant 5% de FBS et 5% de sérum bovin (DBS : Cansera International, Rexdale, Ontario, Canada), 2,5 U/mL de pénicilline, 2,5 μ g/mL de streptomycine et 0,5 μ M d'acide rétinoïque (AR : Sigma-Aldrich)). Les cellules forment des agrégats flottants dans les pétris bactériologiques et se différencient en neurones sous l'action de l'AR. Le traitement avec l'AR a été appliqué sur une période de quatre jours avec un changement de milieu au jour 2. Au jour 4, les agrégats ont été sédimentés dans un tube conique (Sarstedt) de 15 mL, le milieu de différenciation a été retiré et les agrégats ont été rincés à deux reprises avec du PBS. Les agrégats ont ensuite été trypsinisés par incubation dans la solution T-EDTA pendant 3 min. La trypsination a été arrêtée avec du milieu complet comme mentionné précédemment. Les cellules ont été individualisées par pipettages, sédimentées puis suspendues dans du milieu Neurobasal supplémenté (NB-S : Neurobasal™ contenant 2% v/v B27™, 0,5 mM de L-glutamine (Gibco-BRL), 2,5 U/mL de pénicilline et 2,5 μ g/mL de streptomycine) et comptées. Les cellules ont ensuite été ensemencées à une densité de 800 cellules/mm² dans des pétris tissulaires ou des plaques multipuits préalablement gélatinisés (Sarstedt) contenant du NB-S. La gélatinisation des surfaces de culture a été faite avec l'ajout une solution de 0,1% de gélatine (Sigma-Aldrich) dans l'eau stérile, de manière à couvrir toute la surface de culture, pendant 20 min à température ambiante. L'excès de gélatine a été éliminé avec deux rinçages à l'eau nanopure stérile. Le milieu Neurobasal supplémenté permet la croissance des neurones et non celle des cellules fibroblastiques qui sont également produites lors du traitement avec l'AR. Ainsi, il est possible de maintenir et ce, durant quelques jours, des cultures contenant au-delà de 95% de neurones.

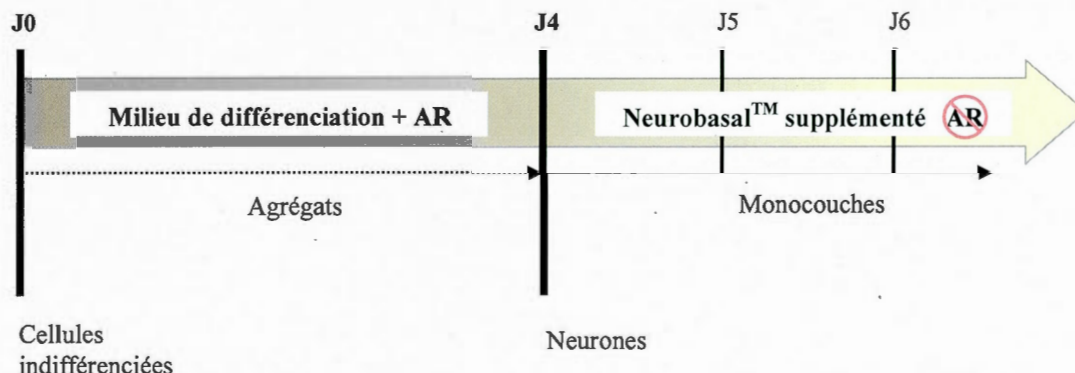


Figure 2.1 Résumé du protocole de différenciation neuronale de cellules P19 à l'aide de l'AR.

2.3.3 Traitement des neurones P19 avec la CP et des inhibiteurs de protéases

Au jour 4 de la différenciation neuronale, les neurones P19 ont été trypsinisés puis ensemencés à une densité de 800 cellules/mm² sur support tissulaire gélatinisé dans du NB-S. La CP (0,5 mg/mL ou 3,8 μ M), le SBTI (100 μ g/mL) et l'aprotinine (30 μ g/mL) (les deux de Sigma-Aldrich) ont été ajoutés seul ou en combinaison dans le milieu de culture lors de l'ensemencement. Les cultures témoins ne contenaient ni CP, ni SBTI, ni aprotinine. Après 48 h de traitement, les cultures ont été analysées morphologiquement (section 2.3.4). Les milieux de culture ont été prélevés, centrifugés à 10 000 g pendant 10 min et les surnageants ont été additionnés d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cocktail I, Sigma-Aldrich) puis conservés à -20°C pour analyse. Des lysats cellulaires ont aussi été prélevés (section 2.3.5) et conservés à -20°C jusqu'à analyse.

2.3.4 Analyse morphologique des cultures cellulaires

L'évaluation morphologique des cultures a été effectuée à l'aide d'un microscope inversé Nikon TMS-F à contraste de phase, muni d'un objectif Ph1 DL (Nikon), à un grossissement de 100X. Le microscope est muni d'un dispositif à photos numérique Nikon F70.

2.3.5 Préparation des lysats cellulaires

Des neurones P19 ont été rincés avec du PBS et récoltés par grattage dans trois fois 1 mL de PBS, par pétri. Les suspensions de cellules ont été centrifugées à 1000 g durant 1 min à température ambiante. Après avoir retiré le surnageant, les cellules ont été rincées avec du PBS et centrifugées à nouveau. Par la suite, le surnageant a été retiré méticuleusement et le tampon de lyse RIPA (150 mM NaCl, 1% v/v Nonidet-40 (Sigma-Aldrich), 0,5% v/v désoxycholate, 0,1% sodium dodécyl sulfate (SDS : Sigma-Aldrich), 50 mM Tris (Sigma-Aldrich), pH 7,6) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases I (cocktail I de Sigma-Aldrich), a été ajouté à raison de six volumes de solution par volume de culot cellulaire. La suspension résultante a été incubée sur glace pendant 30 min tout en étant agitée, par vortex doux, pendant 10 sec à toutes les cinq minutes durant cette période, puis centrifugée à 10 000 g pendant 10 min à l'aide d'une microcentrifugeuse. Le surnageant final, qui correspond au lysat total, a été récupéré puis dosé pour le contenu protéique par la méthode microBCA, et congelé à -20°C jusqu'à utilisation ultérieure.

2.4 Dosage des protéines

2.4.1 Méthode micro-Bradford

Une aliquote de 10 µL d'échantillon de protéines a été ajoutée à un volume de 200 µL de réactif de Bradford (Biorad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada), préalablement dilué 1:4 dans l'eau distillée, dans des puits d'une microplaque de 96 puits (Sarstedt). Après 10 minutes d'incubation, la microplaque a été lue à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Une courbe étalon a été réalisée à l'aide de solutions contenant de 0 à 100 µg/mL d'albumine sérique bovine (BSA) préparées dans l'eau distillée.

2.4.2 Méthode microBCA

La méthode de dosage à base d'acide bicinchoninique (BCA : Pierce, Rockford, Illinois, USA) a été utilisée pour l'analyse des protéines de lysats cellulaires totaux parce qu'elle n'est pratiquement pas affectée par la présence de détergents. Le réactif microBCA est préparé selon les recommandations du manufacturier. Pour le dosage, 1 mL du réactif a été additionné à 1 mL d'échantillon ou d'étalon, le tout incubé durant 1 h à 60°C puis lu à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU-6

(Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). Des solutions de 0 à 40 µg/mL de BSA préparées dans l'eau distillée ont été utilisées pour construire une courbe d'étalonnage.

2.5 Électrophorèse et immunobuvardage

2.5.1 Électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les échantillons ont été préparés dans du tampon d'échantillon Laemmli (TEL : 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% v/v glycérol, 2% p/v SDS, 5% v/v β-mercaptoéthanol et 6,25% p/v bleu de bromophénol; Laemmli, 1970). Les échantillons ont été bouillis pendant 5 min, centrifugés à l'aide d'une microcentrifugeuse pendant 30 sec, puis chargés sur un gel de 6 ou 10% polyacrylamide (selon le cas) et de 1 mm d'épaisseur, en présence de sodium dodécylsulfate (SDS). Les échantillons ont migré pendant 15 min à 75 volts, puis 75 min à 150 volts (dans le cas d'un gel à 6%), ou 75 min à 115 volts (pour un gel de 10%), en utilisant un appareil Mini-Protean (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, USA). Un mélange de protéines étalons (Bio-Rad Laboratories) a également été déposé sur gel pour la calibration des poids moléculaires. Après électrophorèse, les gels ont été colorés au nitrate d'argent ou analysés par électrotransfert et immunobuvardage.

2.5.2 Coloration des gels au nitrate d'argent

La méthode de coloration au nitrate d'argent permet de détecter la présence de protéines contenues dans un échantillon à de très faibles quantités, de l'ordre du nanogramme. Les solutions de sensibilisation, de coloration et de développement ont été préparées selon les recommandations du fabricant (SilverSNAP® Stain Kit II : MJS Biolynx inc. Brokville, Ontario, Canada). Après électrophorèse, les gels ont été lavés avec de l'eau nanopure, puis fixés avec une solution de 30% éthanol (EtOH) et 10% acide acétique dans l'eau et ce, durant 30 min avec un changement de la solution après 15 min. Les gels ont été lavés dans une solution de 10% EtOH (deux fois 5 min) et dans l'eau nanopure (deux fois 5 min) puis incubés dans une solution de sensibilisation durant 1 min et relavés avec de l'eau nanopure. Les gels ont ensuite été incubés pendant 30 min avec la solution de coloration. Après deux lavages de 20 sec chacun à l'eau nanopure, les gels ont été incubés avec la solution de développement jusqu'à ce que des bandes apparaissent avec l'intensité désirée (environ 90 sec). Le développement a été arrêté avec l'ajout d'une solution de 5% d'acide acétique. Les gels ont été transférés sur pellicules ou feuilles de cellophane pour être séchés durant 48 h, puis numérisés à l'aide du scanneur Chemilmager 5500™ (Alpha Innotech®, Californie, USA).

2.5.3 Électrotransfert en mode semi-sec

Après l'électrophorèse, les gels ont été équilibrés durant 5 min dans un tampon de transfert composé de 10 mM Tris, 96 mM glycine (Sigma-Aldrich) et 10-20% MeOH dans l'eau distillée. Les gels ont été apposés par-dessus une membrane de polyvinylidène difluoré (PVDF) (Boehringer-Mannheim, Montréal, Québec, Canada) préalablement activée pendant 1 min dans du MeOH pur et équilibrée pendant 15 min dans du tampon de transfert. Le sandwich gel-membrane a été placé dans le système d'électrotransfert « semi-dry » (The W.E.P. Company, Seattle, Washington, USA) et le transfert des protéines du gel vers la membrane effectué pendant 75 à 90 min, selon le cas, à 1 mA/cm^2 ($\sim 80 \text{ mA/gel}$).

2.5.4 Immunobuvardage de type western

Après électrotransfert des protéines sur membranes de PVDF, celles-ci ont d'abord été bloquées dans un tampon Tris salin-Tween (TBS-Tw : 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,1% v/v Tween-20 (Sigma-Aldrich), pH 7,6) contenant 3% lait écrémé en poudre (Carnation) et ce, durant 18 h à 4°C sous agitation douce avant de procéder à l'immunodétection.

Après blocage, les membranes ont été lavées avec une solution de TBS-Tw, pendant 1 h sous agitation douce avec renouvellement de la solution de lavage aux 15 min. Les membranes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire d'intérêt durant 1 h à température ambiante et sous agitation douce. L'anticorps primaire a été retiré et les membranes rincées au TBS-Tw puis incubées avec un anticorps secondaire approprié conjugué à la peroxydase du raifort, pendant 1 h à température ambiante sous agitation douce. L'anticorps secondaire a par la suite été retiré puis les membranes rincées avec du TBS-Tw. La détection des complexes anticorps-antigènes a été faite par chimioluminescence en incubant la membrane pendant 1 min dans le réactif de la trousse Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) puis en exposant la membrane à un film Fuji Medical X-ray (Fuji Photo Film®, Tokyo, Japon). Les films ont été numérisés à l'aide du scanneur Chemilmager 5500™. L'identité, de même que les conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires employés sont répertoriées dans les tableaux 2.1 et 2.2.

Tableau 2.1 Anticorps primaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage.

Anticorps	Dilution	Conditions d'incubation	Animal hôte	Fournisseur
Anti- β_{III} -Tubuline	1/5000 TBS-Tw, 3% BSA, 0,01% NaN ₃	1 h à température ambiante	Souris Monoclonal (IgG _{2b})	Sigma-Aldrich
Anti-CP humaine	1/2000 TBS-Tw, 3% BSA, 0,01% NaN ₃	1 h à température ambiante	Lapin (Igs)	Dako, Mississauga, Ontario, Canada
Anti-reeline (G10)	1/1000 TBS-Tw, 3% BSA, 0,01% NaN ₃	1 h à température ambiante	Souris Monoclonal (IgG ₁ , κ)	Calbiochem- Novabiochem, San Diego, Californie, USA

Tableau 2.2 Anticorps secondaires et conditions d'utilisation en immunobuvardage.

Anticorps	Dilution	Conditions d'incubation	Animal hôte	Fournisseur
POD-anti-IgG de souris	1/2500 TBS-Tw, 3% lait	1 h à température ambiante	Chèvre [IgG (H + L)]	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Mississauga, Ontario, Canada
POD-anti-IgG de lapin	1/2500 TBS-Tw, 3% lait	1 h à température ambiante	Chèvre (IgG)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Préparation du matériel chromatographique CP-agarose

3.1.1 Optimisation du dosage oxydasique de la CP

Plusieurs essais enzymatiques ont été effectués dans l'optique d'améliorer la sensibilité du dosage de l'activité oxydasique de la CP. Les conditions du milieu réactionnel depuis longtemps établies pour le dosage de l'activité oxydasique sont de 250 mM de tampon NaAc pH 5,2, 5 mM EDTA et 10 mM *p*PD, et le *p*PD est préparé sous forme de solution mère dans du tampon 1 M NaAc. Les résultats présentés à la figure 3.1 montrent que dans cette condition (condition 1), la présence de 2,0 mg/mL de CP dans le milieu réactionnel induit l'oxydation du *p*PD à un taux de 21,8 mOD/min. La préparation du *p*PD dans l'eau (condition 2) n'augmente que légèrement la vitesse enzymatique de la CP, comparativement au *p*PD préparé dans du tampon 1 M NaAc, pH 5,2 (condition 1). Il est à noter que la préparation du *p*PD dans l'eau assure une meilleure stabilité de ce substrat, i.e. le *p*PD s'auto-oxyde très lentement dans l'eau, comparativement au tampon NaAc (résultat non montré). Par ailleurs, une forte augmentation de la vitesse enzymatique est observée lorsque le tampon NaAc-EDTA pH 5,2 est substitué pour un tampon 50 mM KPi, pH 7,0 (condition 3), indiquant qu'un pH moins acide est bénéfique pour l'activité de la CP. La vitesse de réaction dans le NaPi est la même que celle obtenue dans le KPi (non montré). La courbe de la condition 3 montre un plafonnement rapide dans la formation du produit de la réaction indiquant une trop grande quantité de CP. La figure 3.2 présente donc un dosage de l'activité enzymatique avec une concentration de CP 10 fois moins grande, soit de 0,2 mg/ml. Le résultat indique une détection environ 15 fois plus sensible de l'activité oxydasique lorsque la réaction est effectuée dans du KPi pH 7,0 que dans du NaAc pH 5,2.

3.1.2 Rendement du couplage

Le choix de la matrice pour le couplage est guidé par le type de groupes disponibles sur le ligand à immobiliser ainsi que la nature de l'interaction avec le produit à purifier. Le Sepharose 4B activé au bromure de cyanogène (CNBr-Sepharose®) permet d'immobiliser une protéine via ses groupements amines primaires présents en surface et cela, de façon spontanée et rapide. Deux réactions de couplage de la CP à des billes de CNBr-Sepharose ont été réalisées, l'une à faible (5 mg de CP/g d'agarose) et

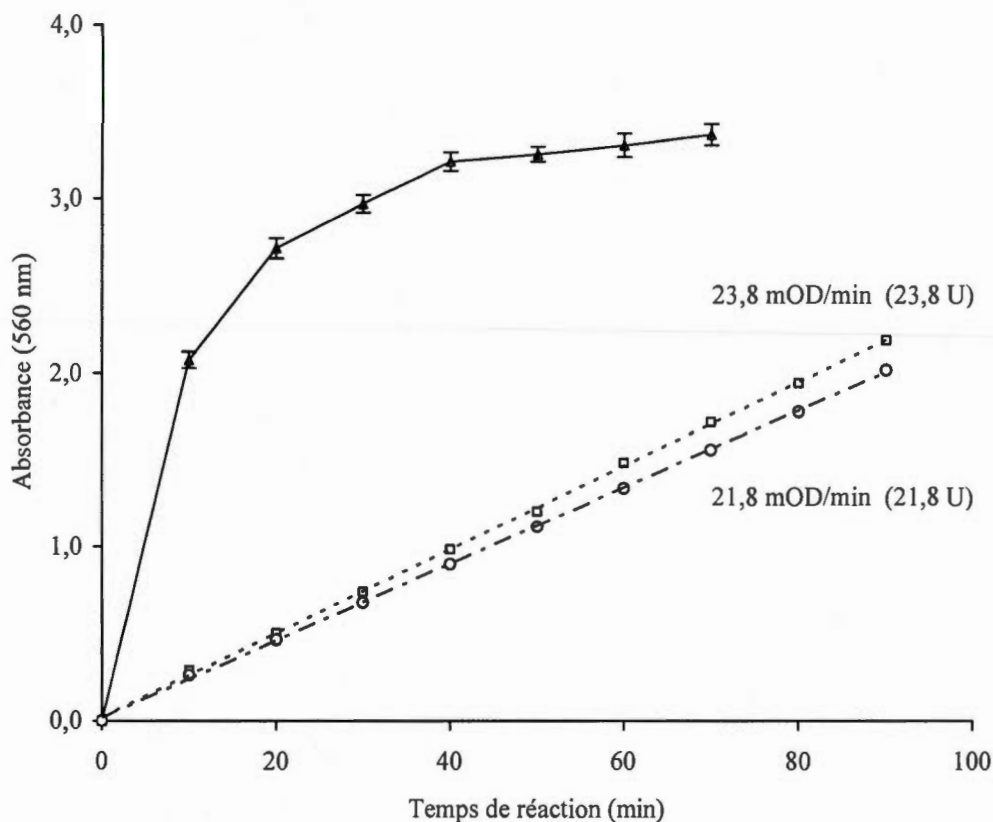


Figure 3.1 Dosage de l'activité oxydasique de la CP dans différents milieux réactionnels. L'activité oxydasique a été déterminée en suivant l'oxydation du *p*-phénylènediamine (*p*PD) par spectrophotométrie à 560 nm. Le milieu réactionnel de la condition 1 (-○-) contient 250 mM de tampon NaAc pH 5,2, 5 mM d'EDTA et 10 mM *p*PD préparé dans du NaAc 1M, pH 5,2. Le milieu réactionnel de la condition 2 (-◻-) est identique à celui de la condition 1 à l'exception que le *p*PD est préparé dans l'eau. Le milieu réactionnel de la condition 3 (-▲-) contient 50 mM de tampon KPi pH 7,0 ainsi que 10 mM de *p*PD préparé dans l'eau. Tous les dosages ont été effectués avec une concentration finale en CP de 2,0 mg/ml. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm écarts moyens pour trois déterminations. Plusieurs écarts moyens ont des valeurs inférieures à la taille des symboles.

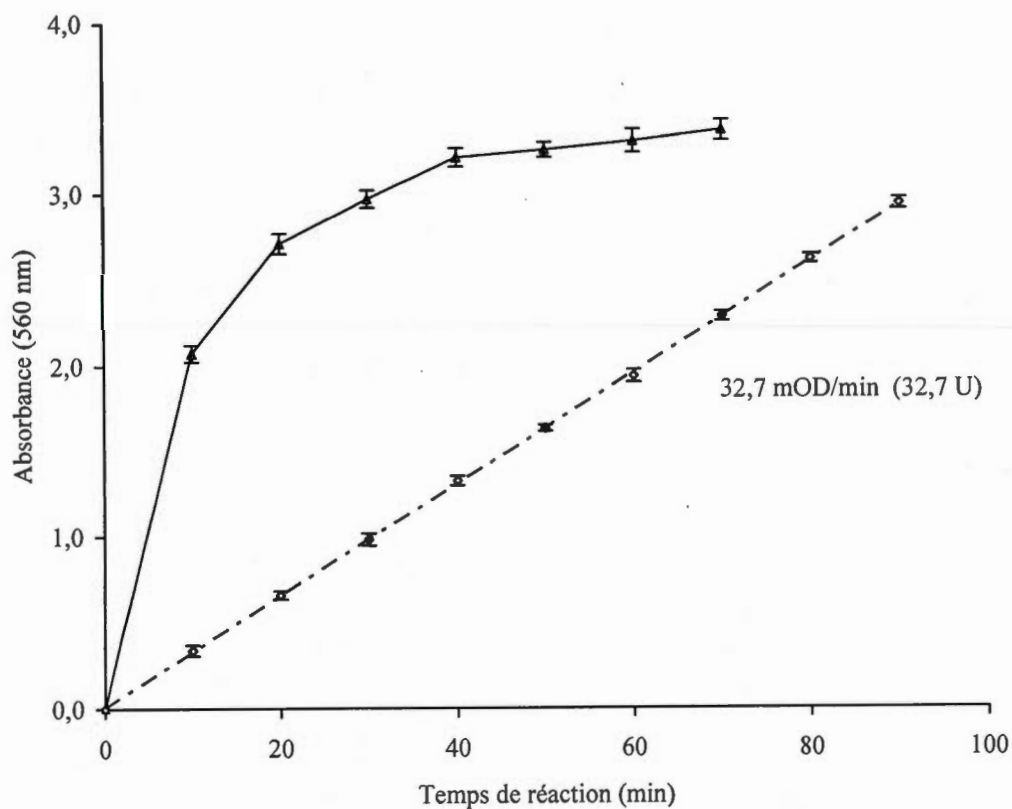


Figure 3.2 Dosage de l'activité oxydasique à deux concentrations de la CP. L'activité oxydasique a été déterminée en suivant l'oxydation du *p*PD par spectrophotométrie à 560 nm. Le milieu réactionnel contient 10 mM de *p*PD et 50 mM de tampon KPi pH 7,0. Deux concentrations en CP dans le milieu réactionnel ont été testées, soient 2,0 mg/ml (-▲-) et 0,2 mg/ml (-◇-). Les résultats (moyennes \pm écarts moyens) sont pour trois déterminations.

l'autre à forte quantité de la protéine (30 mg de CP/g d'agarose), et l'efficacité du couplage a été évaluée en fonction de la quantité résiduelle de protéine dans le surnageant et du recouvrement en activité oxydasique associée à la CP couplée aux billes de CNBr-Sepharose.

Après couplage de la CP à l'agarose, la mesure de l'activité oxydasique de la CP a été réalisée afin de vérifier l'intégrité structurale et fonctionnelle de la protéine. Visuellement, la CP immobilisée sur agarose confère une couleur bleue à la matrice chromatographique, qui est plus visible à haute quantité de CP (fig. 3.3). Cette observation suggère à priori que la CP conserve bien son intégrité structurale et fonctionnelle. Le dosage oxydasique de la CP montre que l'activité de la protéine a été préservée jusqu'à près de 57% dans le cas du couplage à forte quantité de CP, comparativement à l'activité de la CP fraîchement décongelée (fig. 3.4). Le recouvrement de l'activité de la CP à faible réticulation est environ deux fois moindre que celle de la CP à forte réticulation. La CP traitée dans les mêmes conditions que le couplage, mais sans ajout d'agarose, montre une activité beaucoup moindre que la CP réticulée à l'agarose et ce, pour les deux réactions de couplage. Ceci indique que la réticulation de la CP à l'agarose a un effet stabilisateur sur l'activité de la protéine. Il est à noter que tous les dosages d'activité ont été faits avec la même concentration de CP dans le milieu réactionnel, soit 0,2 mg CP/mL.

Le résultat du recouvrement en protéines (CP), autant pour le gel à faible qu'à forte concentration, est de 100%, ce qui indique que toute la CP s'est liée aux billes de CNBr-Sepharose (tableau 3.1). Le couplage à 7,44 mg de CP/ml de gel a permis de recouvrer jusqu'à près de 60% de l'activité spécifique initiale. Ce résultat est environ deux fois plus grand que celui obtenu pour le couplage à 1,24 mg de CP/ml de gel. La plus grande concentration en CP semble donc avoir un effet stabilisateur sur la protéine dans les conditions de couplage.

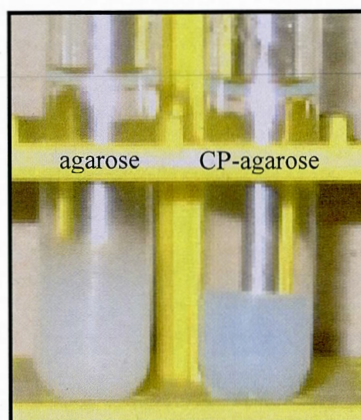


Figure 3.3 La CP immobilisée sur l'agarose. L'agarose, gonflé dans une solution de tampon physiologique a une coloration blanchâtre. La CP immobilisée sur les billes d'agarose donne une coloration bleue au gel, qui est plus visible lorsque la réticulation est faite à haute concentration en CP. La CP-agarose est entreposée dans un tampon HBSS-Tw 0,1% à 4°C.

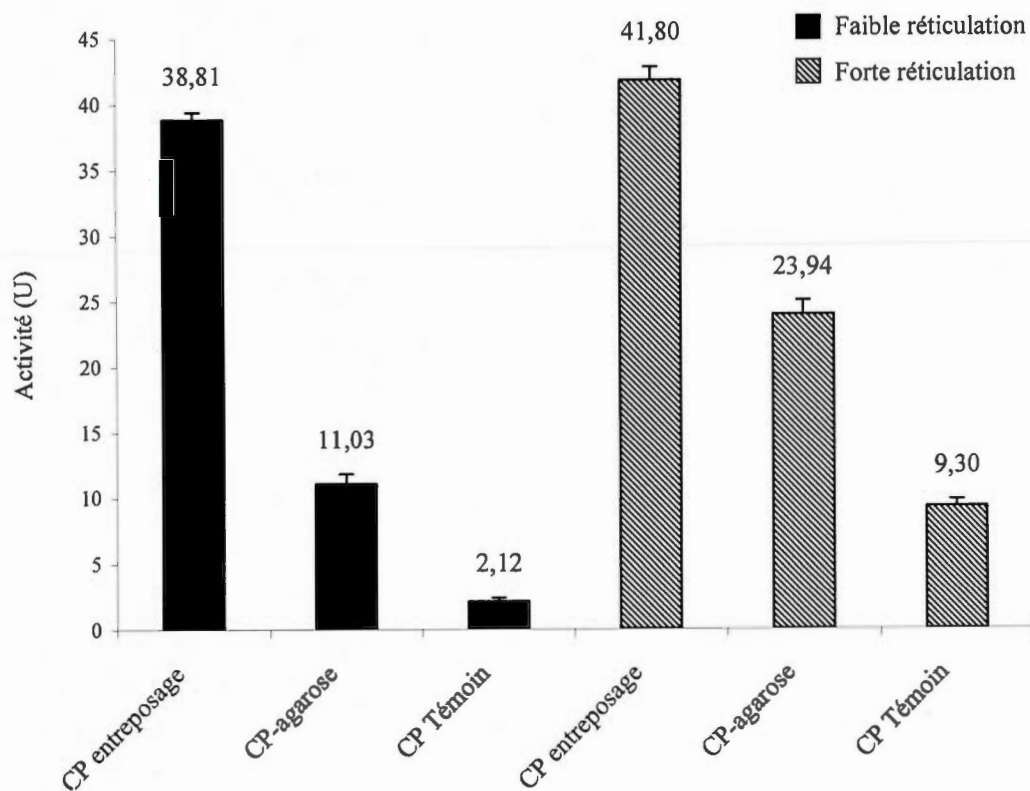


Figure 3.4 Effet du couplage sur l'activité oxydasique de la CP. L'activité oxydasique a été mesurée sur deux préparations de CP-agarose, l'une réalisée à faible concentration de protéine (1,24 mg de CP/mL de gel), l'autre à haute concentration (7,44 mg de CP/mL de gel). Pour chaque préparation, l'activité oxydasique a été mesurée pour la CP fraîchement décongelée (CP entreposage), pour la CP après la réaction de couplage à l'agarose (CP-agarose), ainsi que pour la CP exposée aux conditions du couplage, mais sans ajout d'agarose (CP témoin). L'activité oxydasique a été déterminée en suivant l'oxydation du *p*PD par spectrophotométrie à 560 nm sur une durée de 30 min. Tous les milieux réactionnels contiennent 10 mM de *p*PD, 50 mM de tampon KPi pH 7,0, et 0,2 mg/ml de CP.

Tableau 3.1 Efficacité du couplage de la CP aux billes de CNBr-Sepharose.

	Couplage avec 1,24 mg CP/ml gel			Couplage avec 7,44 mg CP/ml gel		
	Quantité initiale	Quantité associée aux billes	Recouvrement (%)	Quantité initiale	Quantité associée aux billes	Recouvrement (%)
Protéines [†] (mg)	5	5	100	30	30	100
Activité totale (U)	1213	342	28	7858	4454	57
Activité spécifique (U/mg)	243	68	28	262	148	57

[†] La quantité de protéine associée aux billes a été obtenue en soustrayant la quantité de protéine retrouvée dans le surnageant après la réaction de couplage, de la quantité de protéine présente initialement avant couplage.

3.1.3 Stabilité et résistance de la CP-agarose

L'activité oxydasique de la CP couplée à l'agarose a été suivie sur une période allant jusqu'à dix mois après couplage. La figure 3.5 montre que l'activité oxydasique, tant pour le gel à faible qu'à forte réticulation, ne varie pas significativement un mois après la synthèse (activité conservée à 98,5%). Dans les mois qui suivent, l'activité oxydasique de la CP fortement réticulée ne diminue que de 3%/mois, alors qu'il en est de 7%/mois pour le gel à faible quantité de CP. Dix mois suivant la synthèse de la CP-agarose, il est possible de retrouver jusqu'à 70% de l'activité initiale (i.e. après la synthèse) pour le gel à forte quantité de CP et 29% pour la CP faiblement réticulée. Dans les deux cas, les gels de CP-agarose conservent leur couleur bleue caractéristique. Ce résultat montre que la CP immobilisée sur agarose conserve son activité enzymatique pour une longue période suivant la synthèse. Il est à noter que ce matériel a toujours été utilisé dans les quatre premiers mois de sa synthèse pour la chromatographie d'extraits de protéines.

Avant de chromatographier des échantillons biologiques sur CP-agarose, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas de fuite de CP dans les conditions de chromatographie. Une chromatographie test, sans échantillon, a donc été réalisée. Une colonne de CP-agarose a été préparée et conditionnée avec du tampon 20 mM KPi, pH 7,4 contenant 1% Triton X-100. Ce traitement servait à désorber toute molécule de CP non liée de façon covalente à l'agarose. La mesure de l'activité oxydasique de la CP-agarose à la suite de ce conditionnement n'a pas révélé de variation significative (résultat non montré), indiquant que ce traitement n'affecte pas l'intégrité fonctionnelle, et donc aussi structurale, de la CP. La colonne a ensuite été équilibrée / lavée avec du tampon 20 mM KPi, pH 7,4 contenant 0,1% Tween-20, puis soumise à ces mêmes conditions mais en présence de concentrations croissantes de KCl (0,15, 0,5 et 3,0 M). La concentration du tampon KPi est celle rapportée dans la littérature pour la purification du récepteur érythrocytaire de la CP (Puchkova *et al.*, 1990). Un peu de détergent Tween-20 a été ajouté pour éviter la précipitation de protéines membranaires et des études antérieures ont montré que la CP se lie aux neurones P19 en présence de 0,1% Tween-20.

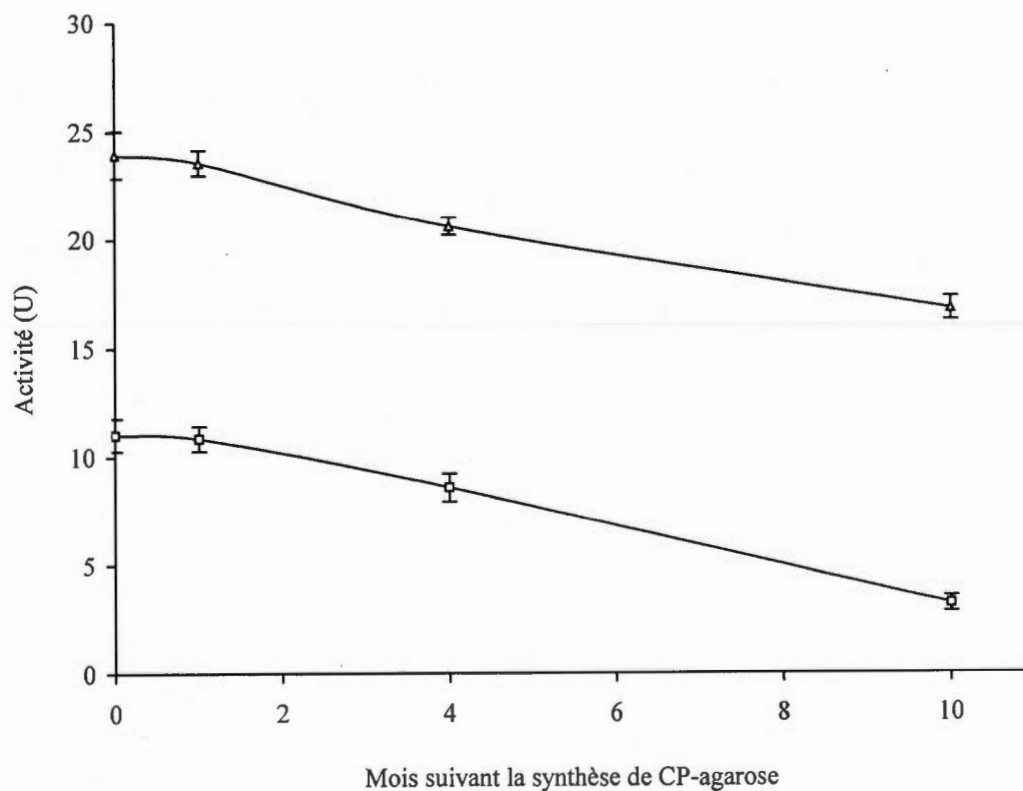


Figure 3.5 Stabilité temporelle de l'activité oxydasique de la CP immobilisée sur agarose. Les conditions du dosage de l'activité oxydasique de la CP sont les mêmes que celles décrites à la fig. 3.4. Tous les dosages ont été effectués avec la même concentration en protéine dans le milieu réactionnel, soit 0,2 mg de CP/mL. La CP-agarose est entreposée dans un tampon HBSS-Tw 0,1% à 4°C. L'expérience a été effectuée sur deux préparations de CP-agarose, l'une fortement (Δ) et l'autre faiblement (\square) réticulée, et les valeurs ont été mesurées en triplicata (moyennes \pm écarts moyens).

Un profil protéique de la chromatographie test est montré dans la figure 3.6A. Les fractions recueillies puis dosées pour leur contenu en protéines montrent par le biais du profil chromatographique par dosage de Bradford qu'il n'y a pas de pic significatif qui serait associé à l'élution de protéine (fig. 3.6A). Ainsi, les conditions salines appliquées à la colonne de CP-agarose ne semblent pas provoquer le détachement de la CP immobilisée sur la matrice, les valeurs de densités optiques étant sous le seuil de détection de protéines ($< 0,020$) pour chacune des étapes. Les valeurs d'absorbance négatives associées aux fractions recueillies lors du conditionnement de la colonne CP-agarose sont le résultat d'une interférence du Triton X-100, lorsque utilisé à 1%, avec le réactif de Bradford. Cet effet s'estompe pour revenir à des valeurs d'absorbance normales (positives) après dilution du Triton X-100, (dès la fraction 63 sur le profil chromatographique). Il est à noter que l'activité oxydasique de la CP a été mesurée à la suite du conditionnement de la colonne et les résultats montrent qu'elle ne varie pas significativement, ce qui indique que son efficacité est maintenue (non illustré).

L'analyse électrophorétique de fractions représentatives recueillies pour les étapes post-conditionnement, combinée à une coloration du gel au nitrate d'argent est présentée à la figure 3.6B. Autant lors du lavage de la colonne que lors de l'application des conditions de désorption avec du KCl, la coloration du gel ne montre pas de bande protéique. Cependant, pour des temps de développement de la coloration prolongés, on note l'apparition de deux bandes mais très faibles (54 et 60 kDa) toujours présentes et d'égale intensité, sans correspondante dans la préparation de CP. Il s'agirait de signaux fantômes puisqu'ils sont constamment présents dans tous les profils chromatographiques. Ceci est visible seulement lors d'une exposition plus longue des gels à la solution de développement utilisée pour la coloration au nitrate d'argent. Ce doublet peut d'ailleurs être détecté sur d'autres gels colorés au nitrate d'argent aussi bien dans d'autres expériences chromatographiques indépendantes de celle-ci (voir par exemple les chromatographies d'un extrait de protéines membranaires d'érythrocytes bovins, fig. 3.7 et d'extrait de neurones P19 sur CP-agarose, fig. 3.8). Il est possible que ce soit un effet quelconque des solutions tampons utilisées pour la chromatographie, mais la cause n'est pas encore clairement élucidée. Enfin, il est à noter que la couleur bleue du gel, conférée par les atomes de cuivre de coordination de type I de la CP immobilisée sur la matrice, demeure non perturbée tout au long des étapes chromatographiques, témoignant de la stabilité de l'état conformationnel natif de la protéine dans les conditions utilisées. Ces conditions ont donc été retenues pour l'analyse d'extraits biologiques.

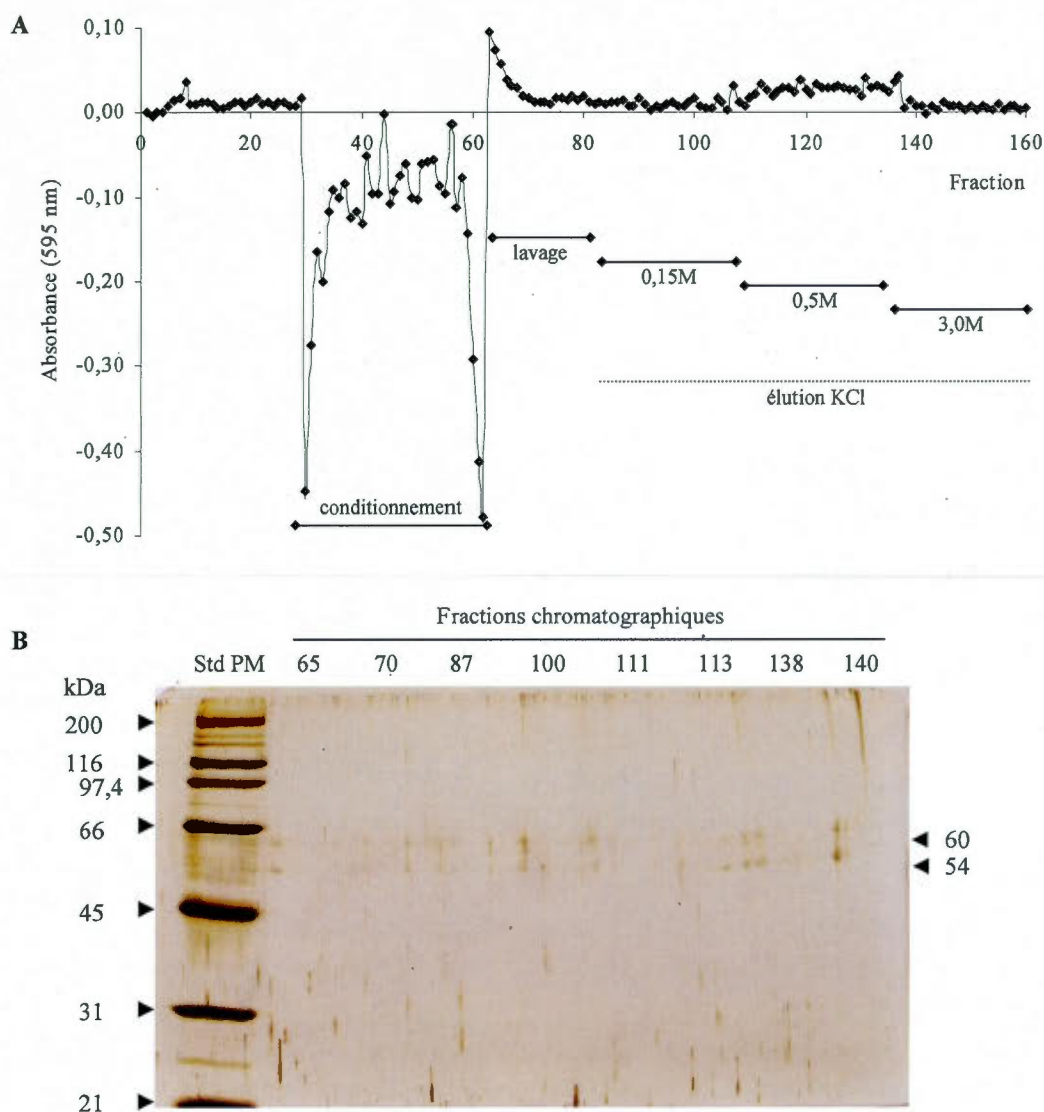


Figure 3.6 Résistance de la CP immobilisée sur agarose aux conditions chromatographiques. **A** Profil chromatographique par dosage de Bradford des protéines. La colonne CP-agarose hautement réticulée en CP (7,44 mg/ml gel) a été conditionnée avec 10 volumes (vol) de tampon 20 mM KPi pH 7,4 (tampon A) additionné de 1,0% Triton X-100, puis 10 vol de tampon A contenant 0,1% Triton X-100. La colonne a été équilibrée/lavée avec 10 vol de chacune des conditions suivantes; tampon A - 0,1% Tween-20 contenant 0,15, 0,5 et 3,0M KCl. Les fractions recueillies (200 μ l) ont été dosées par dosage de Bradford et l'absorbance lue à 595 nm. Une valeur de densité optique inférieure à 0,020 indique que la fraction ne contient pas significativement de protéine. **B** Trente μ l de fractions de lavage (fractions 65 et 70), de désorption à 0,15M KCl (fractions 87 et 100), 0,5M KCl (fractions 111 et 113) et à 3,0M KCl (fractions 138 et 140) ont été analysés par SDS-PAGE (10% acrylamide), suivi d'une coloration au nitrate d'argent. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) de protéines étalons. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

3.2 Chromatographie d'extraits cellulaires sur CP-agarose

3.2.1 Chromatographie d'érythrocytes bovins

En appliquant une préparation membranaire d'érythrocytes humains sur une colonne de CP-agarose, Barnes et Frieden (1984) ont observé la rétention d'une protéine de 60 kDa qu'ils ont pu éluer en élevant la concentration de potassium. En utilisant des conditions similaires à celles rapportées par ces chercheurs, nous avons vérifié les résultats obtenus avec des érythrocytes.

Un extrait de protéines membranaires érythrocytaires (9 mg) a été déposé sur une colonne CP-agarose à forte réticulation (7,44 mg de CP/mL de gel). Le profil chromatographique à 595 nm montre un pic d'élution situé à 0,5M KCl et dont la D.O. est environ de deux fois supérieure à celle du bruit de fond (D.O. de 0,040 versus 0,020) (fig. 3.7A). Un autre petit pic d'une D.O. \approx 0,040 apparaît aussi au début de l'élution avec 3 M KCl. L'analyse électrophorétique de fractions recueillies pour chacune des étapes, combinée à une coloration au nitrate d'argent, montre (fig. 3.7B) que l'extrait de protéines membranaires avant passage sur la colonne (puits H) contient un nombre limité de bandes protéiques fortement colorées, dont des bandes d'environ 50, 45, 37, 28 et 25 kDa parmi les plus visibles. Les puits identifiés par des numéros correspondent aux fractions chromatographiques analysées. Les puits correspondant à la portion non retenue sur la colonne (puits 10-25) montrent qu'un bon nombre de protéines ne s'est pas lié à la CP (e.g. des protéines de 25, 28 et 37 kDa). Les fractions recueillies à la fin du lavage (puits 40-45) ne contiennent plus de protéines détectables à l'exception des deux bandes fantômes retrouvées de manière constante dans tous les puits ainsi qu'indépendamment des différentes étapes chromatographiques. Il est possible de constater que dans les fractions correspondantes à l'étape de désorption à 0,5M KCl (puits 55 à 57), une bande faible mais très nette apparaît, correspondant à une protéine ayant une taille moléculaire d'environ 30 kDa. Cette bande qui est visible sur quelques fractions (puits) correspond à un pic d'absorbance par dosage des protéines. La bande de 30 kDa pourrait être attribuée au récepteur érythrocytaire de la CP, la glycophorine, laquelle existe sous les formes de 30 et 60 kDa, correspondant respectivement aux formes monomérique et dimérique (Barnes et Frieden, 1984; Puchkova *et al.*, 1990). Ainsi, la bande observée à 30 kDa peut correspondre à la forme monomérique de ce récepteur, la forme dimérique native pouvant être dénaturée lors de la préparation de l'échantillon pour l'électrophorèse ou cachée par les bandes fantômes. À 3,0M KCl, aucune bande n'est observée sur le gel (puits 76-80).

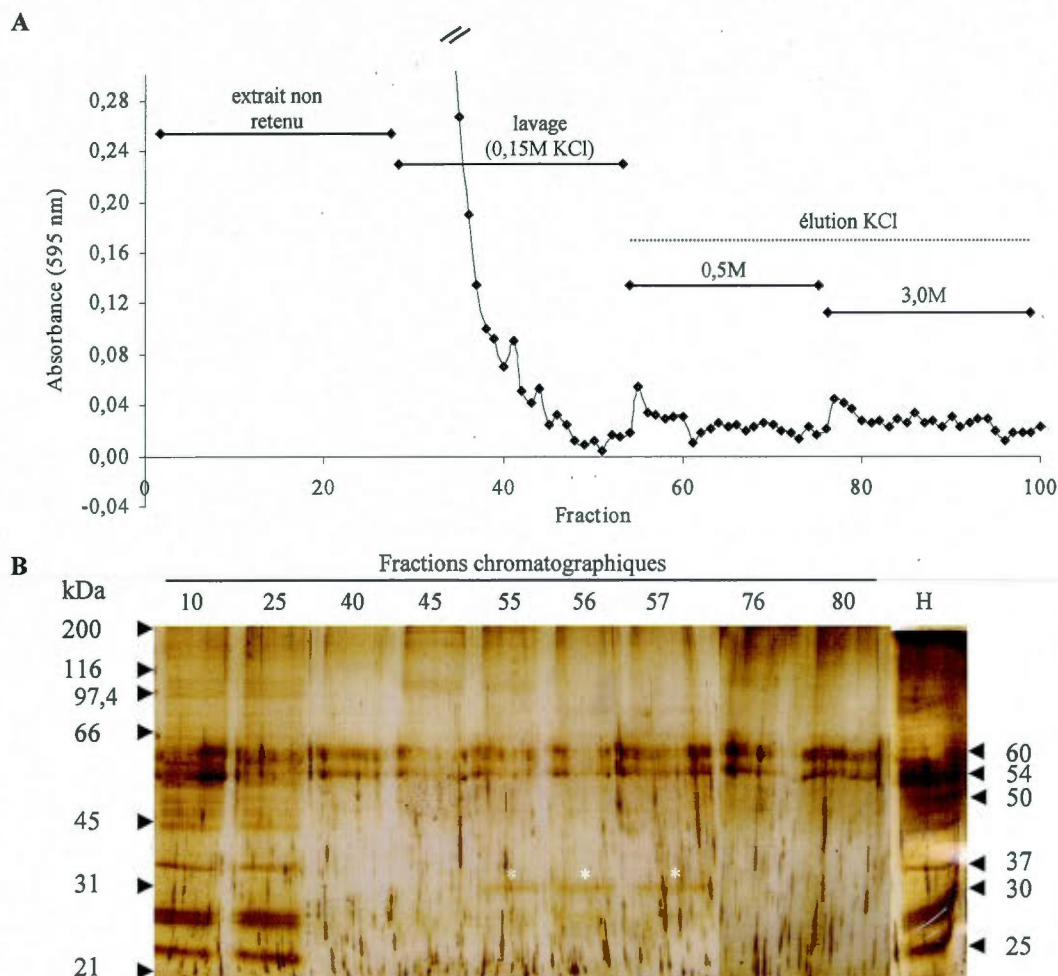


Figure 3.7 Analyse protéique de la chromatographie d'extraits membranaires d'érythrocytes bovins sur CP-agarose. Un extrait de protéines membranaires solubles dans 1% Triton X-100 a été préparé à partir d'érythrocytes bovins frais et en présence d'inhibiteurs de protéases. L'extrait (9 mg) a été dilué à 0,1% Triton dans du tampon KPi 20 mM, pH 7,4 contenant 0,15M KCl et des inhibiteurs de protéases, puis déposé (en cycle, pendant 18 h à 4°C) sur une colonne de CP-agarose (7,44 mg CP/mL de gel) préalablement conditionnée (fig. 3.6) et équilibrée dans le tampon KPi additionné de 0,1% Tween-20 (KPi-Tw) et 0,15M KCl. La colonne a été lavée avec 10 volumes (vol) de KPi-Tw contenant 0,15M KCl, puis désorbée avec 10 vol de 0,5M KCl et 10 vol de 3,0M KCl dans le tampon KPi-Tw. **A** Profil chromatographique des fractions recueillies (200 µl) par dosage de Bradford des protéines. Les valeurs d'absorbance ont été lues à 595 nm. Une valeur de densité optique inférieure à 0,020 indique que l'échantillon ne contient pas significativement de protéine. **B** Trente µl de fractions représentatives des différentes étapes chromatographiques (extrait non retenu : 10 et 25; lavage : 40 et 45; désorption à 0,5M KCl : 55 à 57; désorption à 3,0M KCl : 76 et 80), ainsi que 2 µg d'extrait de protéines membranaires (H), ont été analysés par SDS-PAGE (10% acrylamide) et coloration au nitrate d'argent. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) de protéines étalons, les nombres à droite donnent la taille moléculaire des principales bandes protéiques des échantillons. Les astérisques surmontent la bande de 30 kDa désorbée à 0,5M KCl.

L'isolation d'une protéine de 30 kDa à partir de la chromatographie d'une préparation d'érythrocytes bovins sur notre colonne de CP-agarose suggérait l'adéquation de notre matériel chromatographique comme outil dans l'identification de protéines de liaison spécifiques de la CP à partir d'autres tissus ou cellules.

3.2.2 Chromatographie d'extraits de neurones P19

Dans un premier temps, un extrait de protéines totales de neurones P19 a été chromatographié sur CP-agarose puisque des études antérieures avaient montré une interaction de la CP avec ces neurones (Maltais *et al.*, 2003).

Un extrait (2 mg de protéines) de lysat de neurones P19 récoltés au J5, a été déposé sur une colonne CP-agarose hautement réticulée (7,44 mg de CP/mL de gel) en présence de 0,15 M KCl. Le profil chromatographique à 595 nm montre, à la suite du passage de l'extrait et du lavage de la colonne, un pic d'élution situé à 0,5M KCl et dont la D.O. est environ de trois fois supérieure au bruit de fond (D.O. de 0,060 versus 0,020) (fig. 3.8A). Également, un pic d'une amplitude comparable est obtenu au début de l'étape de lavage de la colonne avec le tampon usuel contenant 0,15M KCl. Aucune protéine ne semble être désorbée avec 3,0M KCl, les valeurs d'absorbance à 595 nm étant visiblement sous le seuil de détection de protéine. L'analyse électrophorétique de fractions recueillies pour chacune des étapes, combinée à une coloration au nitrate d'argent, montre (fig. 3.8B) d'abord que l'extrait initial (puits H) contient un grand nombre de bandes protéiques. Les puits subséquents identifiés par des numéros correspondent aux fractions analysées, issues du profil chromatographique. Les puits correspondant au début de l'étape de lavage de la colonne (puits 27 à 29) montrent plusieurs des bandes retrouvées dans l'extrait initial. Les bandes les plus visibles sont associées à des protéines de 36, 45, 48, 65 ainsi qu'à une collection de protéines retrouvées entre 87 et 126 kDa. Pratiquement toutes ces bandes ont disparu vers la fin de l'étape de lavage (puits 32). Il est possible de constater que dans les fractions obtenues au début de la désorption à 0,5M KCl (puits 43 à 48), une bande faible mais distinguable apparaît, correspondant à une taille moléculaire d'environ 48 kDa. Cette bande, visible sur quelques fractions (puits), est en accord avec la présence d'un pic d'absorbance protéique, à cette étape, dans le profil chromatographique. Aucune protéine n'est observée pour l'étape de désorption avec 3,0M KCl (puits 58). Comme évoqué précédemment, on observe la présence du doublet fantôme à 54 et 60 kDa de manière constante dans tous les puits.

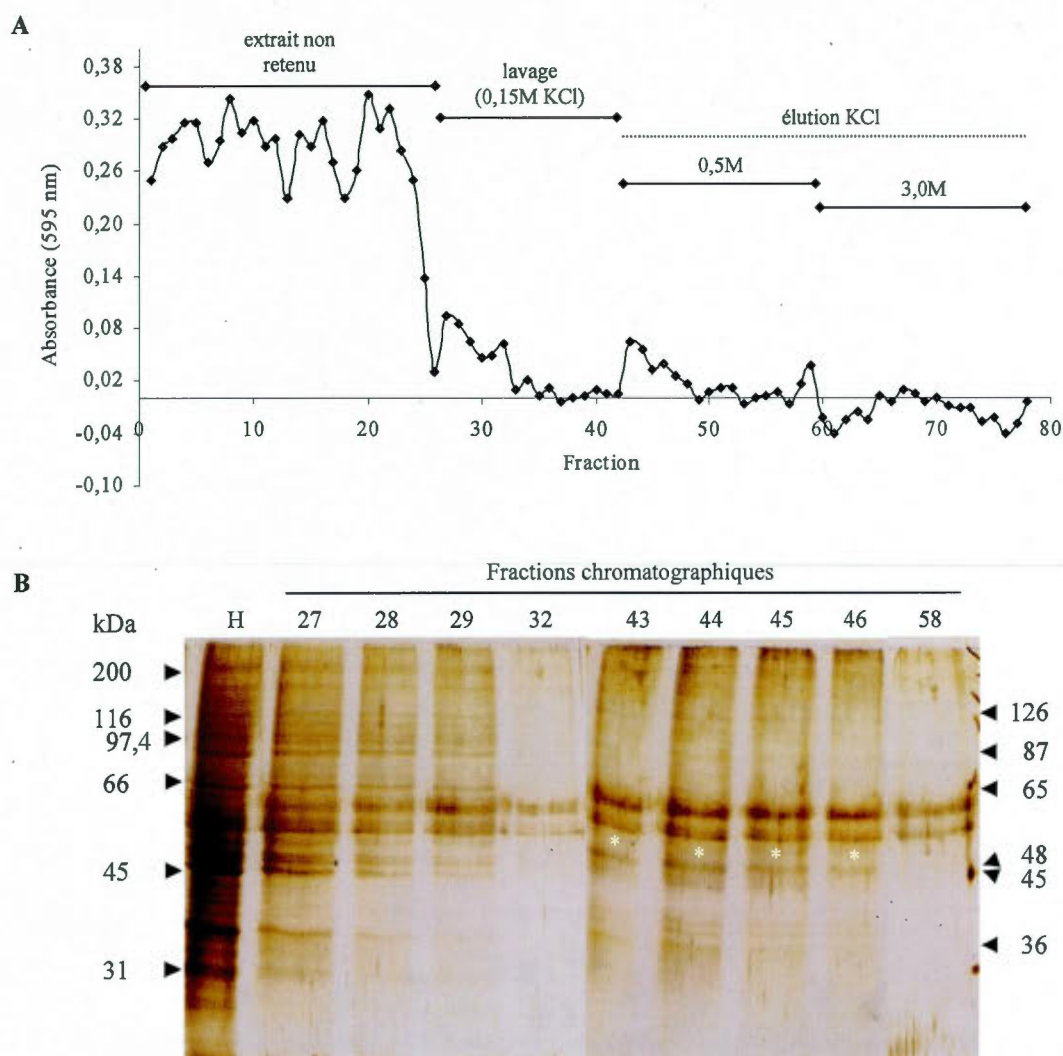


Figure 3.8 Analyse protéique de la chromatographie d'un lysat neuronal P19 sur CP-agarose. Un extrait de protéines totales solubles (2 mg) a été dilué dans du tampon KPi 20 mM, pH 7,4, 0,1% Triton X-100, contenant 0,15M KCl et des inhibiteurs de protéases, puis déposé (en cycle, pendant 18 h à 4°C) sur une colonne de CP-agarose (7,44 mg CP/mL de gel) préalablement conditionnée (fig. 3.6) et équilibrée dans le tampon KPi additionné de 0,1% Tween-20 (KPi-Tw) et 0,15M KCl. La colonne a été lavée avec 10 volumes (vol) de KPi-Tw contenant 0,15M KCl, puis désorbée avec 10 vol de 0,5M KCl et 10 vol de 3,0M KCl dans le tampon KPi-Tw. **A** Profil chromatographique des fractions recueillies (200 µl) par dosage de Bradford des protéines. Les valeurs d'absorbance ont été lues à 595 nm. Une valeur de densité optique inférieure à 0,020 indique que l'échantillon ne contient pas significativement de protéine. **B** Deux µg d'extrait de protéines totales de neurones (H), ainsi que 30 µl de fractions représentatives des différentes étapes chromatographiques (lavage : 27 à 29-32; désorption à 0,5M KCl : 43 à 46; désorption à 3,0M KCl : 58), ont été analysés par SDS-PAGE (10% acrylamide) et coloration au nitrate d'argent. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) de protéines étalons, les nombres à droite donnent la taille moléculaire des principales bandes protéiques des échantillons. Les astérisques surmontent la bande de 48 kDa désorbée à 0,5M KCl.

Bref, la chromatographie d'un extrait de lysat neuronal P19 sur CP-agarose a montré qu'une protéine d'une taille moléculaire approximative de 48 kDa est retenue sur la colonne et éluée avec une force ionique de 0,5M KCl.

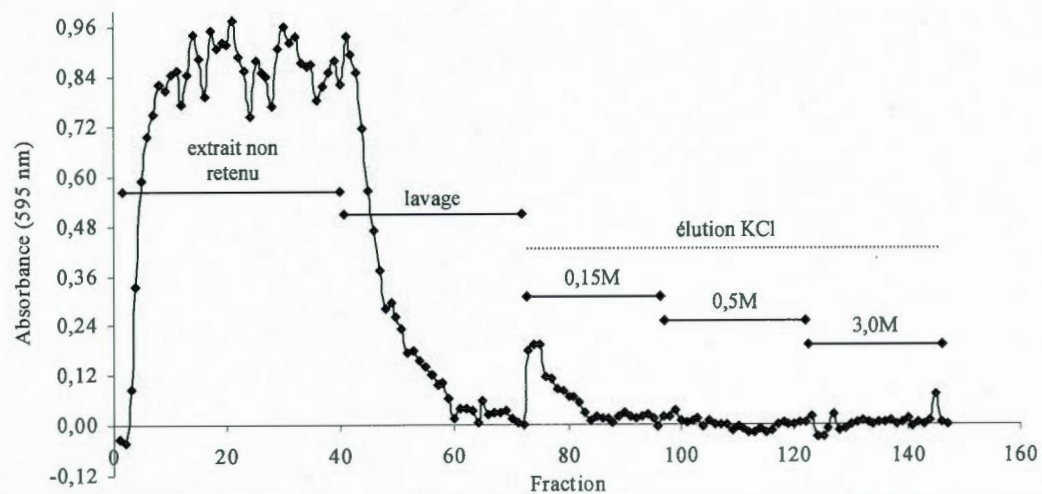
3.2.3 Chromatographie d'extraits de cerveau de rat

Nous avons par la suite voulu déterminer si la protéine de 48 kDa présente dans les extraits de neurones P19 et retenue sur CP-agarose pouvait être présente dans des extraits de cerveaux, sachant que le cerveau est riche en neurones et que la CP se lie à des membranes de cerveau.

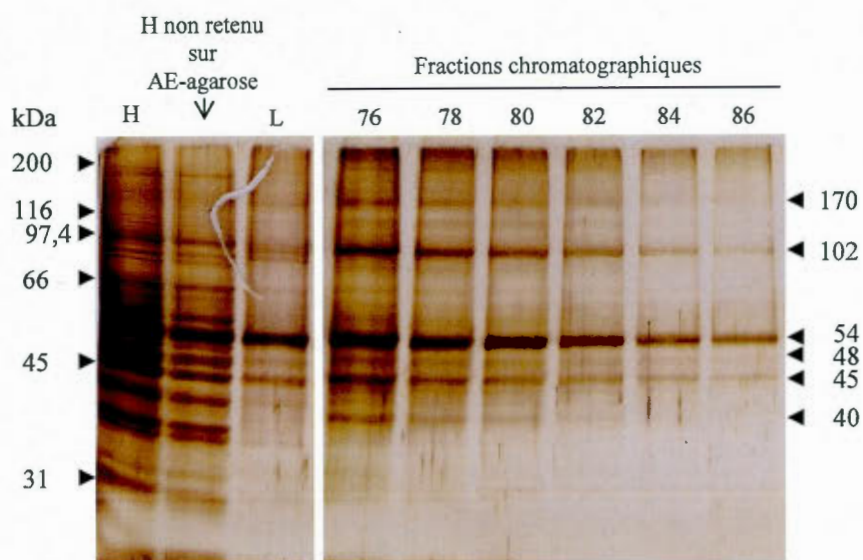
Pour l'analyse d'un extrait de cerveau de rat, nous avons introduit deux modifications au protocole chromatographique. Dans la première modification, les étapes de dépôt de l'échantillon sur CP-agarose et de lavage de la colonne ont été faites en absence de KCl pour augmenter la chance de retenir des protéines de liaison de la CP; par conséquent, une étape de désorption à 0,15M KCl a été ajoutée. La deuxième modification a été l'introduction d'une pré-chromatographie de l'extrait sur AE-agarose afin de retenir la CP endogène du cerveau. L'extrait de protéines totales (6,6 mg) de cerveau de rat adulte a d'abord été déposé sur une colonne d'AE-agarose dans les conditions utilisées pour la purification de la CP bovine. La portion non retenue sur AE-agarose a été déposée sur une colonne de CP-agarose fortement réticulée (7,44mg de CP/mL de gel). Le profil chromatographique déterminé à 595 nm montre un large pic situé au début de l'étape d'élution à 0,15M KCl (pic s'étendant des fractions 73 à 83) et dont la D.O. était supérieure au bruit de fond (D.O. de 0,2 versus 0,020) (fig. 3.9A). Aucun autre pic d'élution n'apparaît pour les étapes d'élution à 0,5 et 3,0 M KCl.

Les fractions recueillies pour chacune des étapes ont été analysées par électrophorèse, suivi d'une coloration au nitrate d'argent. La figure 3.9B montre d'abord que l'extrait de protéines totales de départ (puits H) contient plusieurs bandes protéiques dont certaines sont plus fortement colorées que d'autres. Le profil électrophorétique de la portion de l'extrait non retenue sur AE-agarose est très similaire à celui de l'extrait de départ (H). À la fin de l'étape de lavage, il ne reste que peu de protéines détectables dans les fractions recueillies (puits L). Il est possible de constater que dans les fractions correspondant à l'étape de désorption à 0,15M KCl (puits # 76 à 86) quelques bandes d'intensité variable apparaissent, correspondant à des protéines de 40, 45, 54, 102 et 170 kDa. Une bande très faible apparaît à 48 kDa. Ces bandes sont visibles sur une dizaine de fractions, et leur intensité s'accorde avec le profil protéique par absorbance. Étant donné que les valeurs d'absorbance à 595 nm sont nettement sous le seuil de détection de protéines (moyenne des D.O. de 0,002) pour les autres

A



B



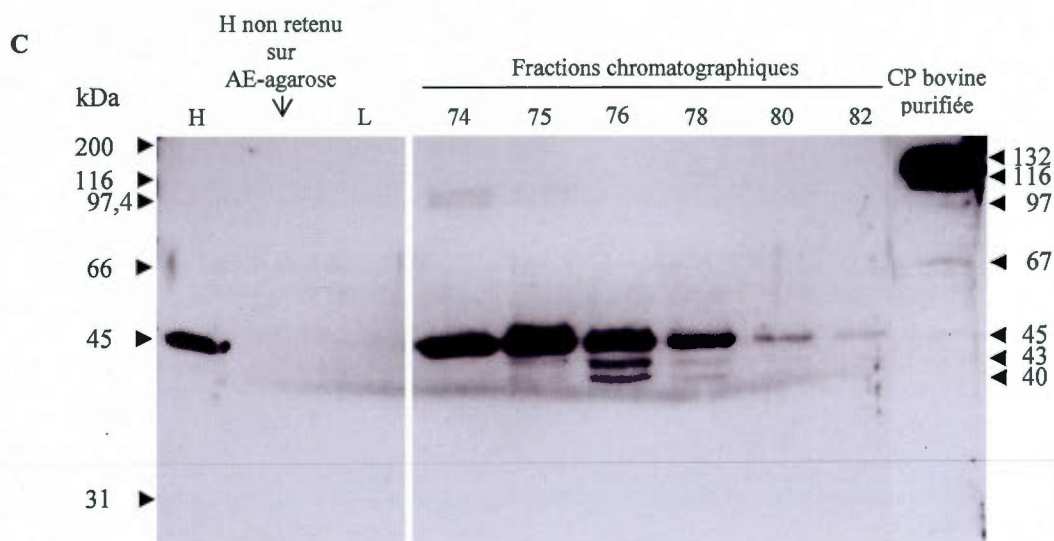


Figure 3.9 Analyse protéique de la chromatographie d'extraits de cerveaux de rats adultes sur CP-agarose. Un extrait de protéines totales solubles dans 1% Triton X-100 a été préparé à partir de cerveaux de rats adultes ($\approx 2,6$ g/cerveau) et en présence d'inhibiteurs de protéases. L'extrait (6,6 mg) a été dilué à 0,1% Triton X-100 dans du tampon KPi 20 mM, pH 7,4 contenant des inhibiteurs de protéases, puis déposé sur une colonne AE-agarose. La fraction non retenue de cette colonne a été appliquée (en cycle, durant 18 h à 4°C) sur une colonne de CP-agarose (7,44mg CP/ml gel) préalablement conditionné (fig. 3.6) et équilibrée dans le tampon KPi additionné de 0,1% Tween-20 (KPi-Tw). La colonne CP-agarose a été lavée avec 10 volumes (vol) de KPi-Tw, puis désorbée avec 10 vol de 0,15M KCl, 10 vol de 0,5M KCl et 10 vol de 3,0M KCl dans le tampon KPi-Tw. **A** Profil chromatographique des fractions recueillies (200 μ l) de la colonne CP-agarose par dosage de Bradford des protéines. Les valeurs d'absorbance ont été lues à 595 nm. Une valeur de densité optique inférieure à 0,020 indique que l'échantillon ne contient pas significativement de protéine. **B** Deux μ g d'extrait de protéines totales de cerveau de rat (H) et de l'extrait non retenu sur AE-agarose, ainsi que 30 μ l des fractions représentatives de certaines étapes chromatographiques (lavage : 70; désorption à 0,15M KCl : 76-78-80-82-84 et 86), ont été analysés par SDS-PAGE (10% acrylamide) et coloration au nitrate d'argent. **C** Deux μ g d'extrait de protéines totales de cerveau de rat (H) et de l'extrait non retenu sur AE-agarose, 0,5 μ g de la préparation de CP bovine purifiée, ainsi que 30 μ l des fractions représentatives de certaines étapes chromatographiques (lavage : 70; désorption à 0,15M KCl : 74 à 76-78-80-82), ont été analysées par SDS-PAGE (10% acrylamide) et immunobuvardage anti-CP, suivi d'un anticorps secondaire conjugué à la POD. Les complexes immuns ont été révélés par chimioluminescence. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) de protéines étalons, les nombres à droite donnent la taille moléculaire des principales protéines détectées des échantillons.

étapes de la chromatographie sur CP-agarose, les fractions recueillies correspondantes n'ont pas été analysées par électrophorèse et coloration au nitrate d'argent.

Nous avons par la suite analysé les échantillons de différentes étapes par immunobuvardage avec un anticorps anti-CP pour déterminer dans quelle mesure la CP cérébrale avait été retenue sur AE-agarose et ne contaminait pas les fractions obtenues de CP-agarose. La figure 3.9C montre une espèce immunoréactive de 45 kDa, mais aucune de 132 kDa, dans l'extrait initial (puits H), contrairement à ce qui est observé pour la préparation de CP plasmatique bovine. La bande immunoréactive de 45 kDa est absente dans la portion de l'extrait non retenue sur AE-agarose, indiquant son adsorption sur ce matériel d'affinité pour la CP; l'adsorption a été confirmée par le fait que cette bande est éluée de l'AE-agarose dans les conditions normalement utilisées pour la CP (résultat non montré). L'analyse immunologique de fractions de CP-agarose ne montre aucune bande immunoréactive dans une fraction de lavage (L) précédant l'élution avec 0,15M KCl. Par contre, la bande de 45 kDa éluée avec cette concentration de sel est fortement reconnue par l'anticorps. Dans certaines fractions, elle est accompagnée d'un doublet immunoréactif de faible intensité à 40 et 43 kDa. Aucune autre espèce immunoréactive n'est détectée dans les fractions chromatographiques de CP-agarose. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats est que le fragment de 45 kDa provient de la CP immobilisée et serait généré par un clivage protéolytique lors du passage de l'extrait de protéines de cerveau de rat. Ce résultat pourrait donc suggérer qu'il y a présence d'une protéase active dans l'extrait au moment de l'application sur CP-agarose. Que ce clivage cible spécifiquement ou non la CP, il demande à être investigué davantage.

En somme, la chromatographie d'un extrait de protéines totales de cerveau de rat a montré que quelques protéines sont retenues sur la colonne de CP-agarose et éluées avec 0,15M KCl. Aucune protéine n'est désorbée de la colonne à 0,5 et 3,0M KCl. Un peptide de 45 kDa élué de la colonne de CP-agarose à 0,15M KCl est immunologiquement reconnu par l'anticorps anti-CP, suggérant qu'il provienne d'un clivage protéolytique de la CP immobilisée par une protéase contenue dans l'extrait de cerveau.

3.2.4 Profil protéique de la CP dans les extraits de cerveau et le plasma de rat

Les résultats chromatographiques d'extraits cérébraux de rat ont soulevé la question d'un profil protéique différent de la CP selon sa localisation. Nous avons donc comparé le profil plasmatique et le profil cérébral de la CP chez le rat. Pour ce faire, des extraits de protéines totales de cerveau de rat adulte et nouveau-né ont été fraîchement préparés et ce, en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases dès l'homogénéisation du tissu. Les extraits, de même qu'une aliquote de plasma de rat adulte, ont été analysés par électrophorèse suivi d'un immunobuvardage avec l'anticorps anti-CP. L'autoluminogramme de la figure 3.10 montre que dans les extraits de cerveaux de rat, tant adulte que nouveau-né, la forme 45 kDa de la CP est prédominante. Lorsque normalisé en fonction du contrôle de chargement sur gel, il semble que la forme 45 kDa de la CP soit légèrement plus abondante dans l'extrait de cerveau adulte, comparativement à l'extrait protéique de rats nouveau-nés. En comparaison, la CP circulante, contenue dans le plasma de rat, se présente majoritairement sous forme native de 132 kDa, avec en moindre importance ses fragments principaux de 116, 97, 67 et 45 kDa.

3.3 Voie protéolytique et la neuroagrégation

3.3.1 Effet d'inhibiteurs de protéases sur l'action neuroagrégative de la CP

Des études préliminaires sur les mécanismes de la neuroagrégation induite par la CP ont soulevé la participation possible de protéases à sérine dans ce phénomène (D. Maltais, mémoire de maîtrise). Le présent travail a donc investigué davantage ce volet qui prend peut-être une importance nouvelle du fait de l'existence de formes clivées de la CP dans le cerveau.

Les expériences, *in vitro*, portant sur la neuroagrégation ont donc été reprises d'abord en étudiant l'effet d'inhibition du SBTI et de l'aprotinine sur l'action agrégative de la CP sur les neurones P19. La figure 3.11A montre une culture de neurones P19 nouvellement différenciés au jour 6. Les neurones sont caractérisés par de petits corps cellulaires, bien répartis sur le support de culture et projetant de nombreuses extensions (neurites) dans toutes les directions. La photo B montre que lorsque les neurones sont mis en présence de CP, à raison de 0,5 mg de CP/mL de milieu de culture, il se produit une neuroagrégation dans un délai d'environ 24-48 h post-ensemencement (J6). Les neurones se rassemblent en agrégats de taille relativement semblable dans lesquels les cellules sont très tassées les unes contre les autres. La photo C montre des neurones cultivés en présence des inhibiteurs de protéases SBTI (100 µg/mL) et aprotinine (30 µg/mL). Les neurones sont bien répartis sur le support

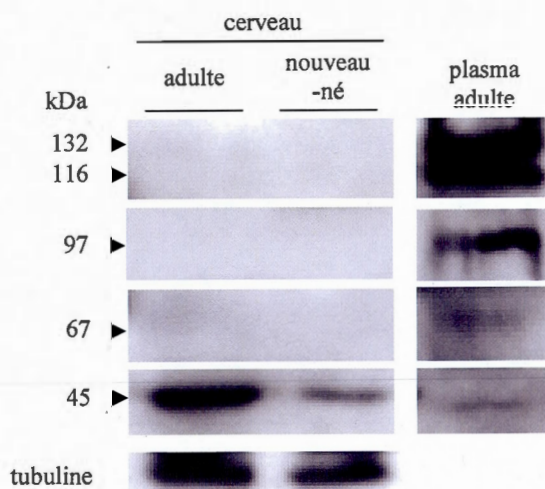


Figure 3.10 Formes de la CP dans les extraits de cerveaux et le plasma chez le rat. La préparation des extraits de cerveaux de rat est conforme à ce qui est décrit à la fig. 3.9. Les protéines, soit 2 μg pour les extraits de cerveaux de rats adultes et nouveau-nés, ainsi que 0,5 μL de la fraction plasmatique adulte ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE (10% acrylamide) et immunobuvardage anti-CP. L'immunoréactivité de la tubuline endogène sert de contrôle du chargement en protéines sur le gel. Les complexes immuns ont été révélés par chimioluminescence. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) des principaux fragments de la CP. L'autoluminogramme est représentatif de trois expériences indépendantes.

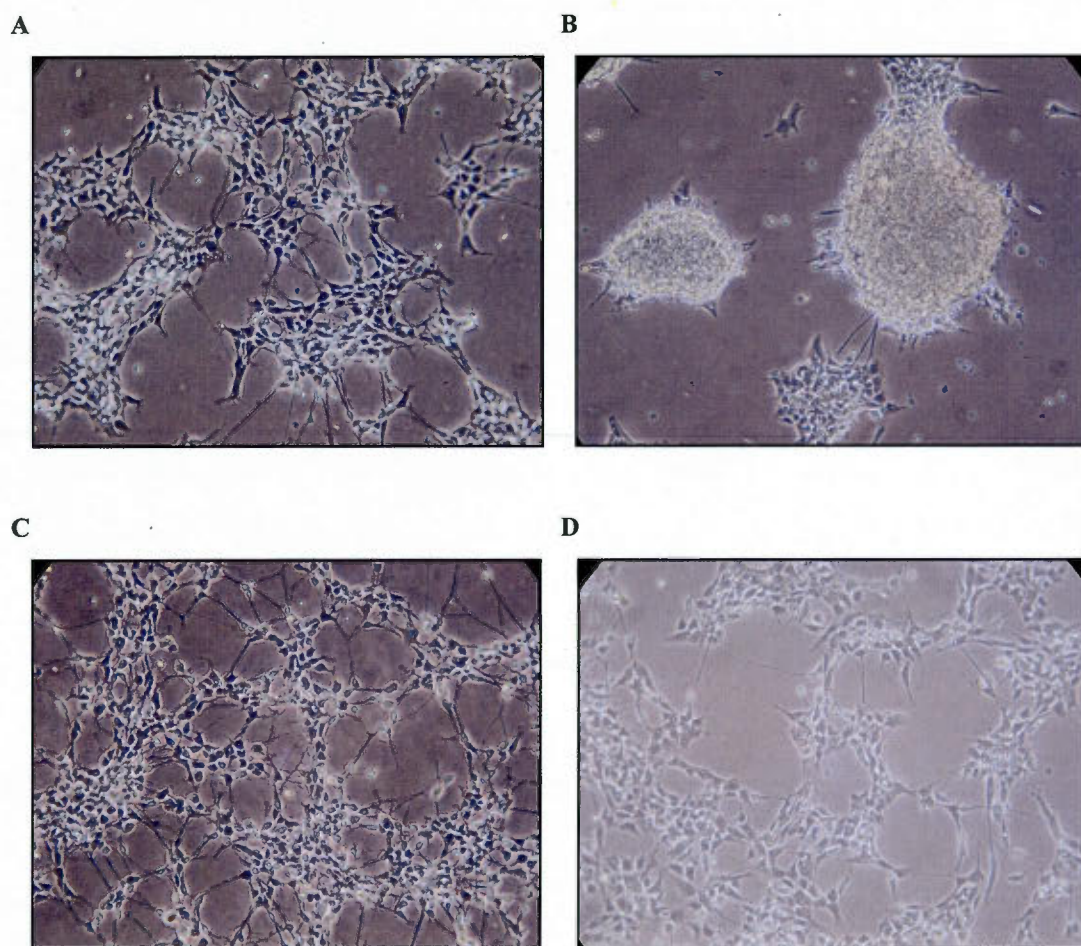


Figure 3.11 Effet inhibiteur du SBTI et de l'aprotinine sur l'action agrégative de la CP bovine sur les neurones P19. Les neurones P19, au jour 4 de neurodifférenciation, ont été incubés durant 48 h sans traitement (A) ou en présence de 0,5 mg/mL de CP bovine (B), des inhibiteurs de protéases à sérine SBTI (100 µg/mL) et aprotinine (30 µg/mL) (C) ou en de CP + SBTI + aprotinine (D). Les clichés pris à un grossissement de 100 X sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

de culture et étendent de nombreuses neurites. À ce propos, il a été observé que l'étalement des neurones de même que l'apparition et le développement des neurites étaient plus précoces en présence qu'en absence des inhibiteurs de protéases (clichés A versus C). Enfin, lorsque les neurones ont été mis en présence de la CP et des inhibiteurs de protéases, la neuroaggrégation normalement induite par la CP a été empêchée et on observe un maintien de l'étalement des neurones très similaire aux neurones sans traitement (photo D).

Dans le but de mieux caractériser le phénomène neuroaggrégatif induit par la CP, en présence ou non des inhibiteurs de protéases, des analyses quantitatives sur les cultures cellulaires ont été réalisées, soient la détermination de la superficie occupée par les cellules ainsi que le dénombrement des neurites et ce, pour les différents traitements appliqués aux neurones. Ce type de caractérisation morphologique des cellules est largement utilisé dans les publications scientifiques afin de consolider les observations, plutôt subjectives, avec des mesures objectives. La figure 3.12A présente la quantification de la surface occupée par les cellules en fonction des traitements appliqués aux neurones. Les neurones sans traitement (témoin) ont été normalisés à 100% et constituent donc le point de référence pour fin de comparaison avec les autres conditions. En présence de la CP, i.e. lorsqu'il y a neuroaggrégation, la surface occupée par les cellules chute de près de 60%, pour s'établir à 37%. Les neurones en présence seulement des inhibiteurs de protéases occupent une surface 40% plus grande que les neurones témoins, ce qui corrobore les observations microscopiques montrant que la présence du SBTI et de l'aprotinine accroît rapidement l'étalement des neurones. En présence des inhibiteurs de protéases et de la CP, les neurones occupent une superficie équivalente aux neurones témoins.

Les résultats portant sur le dénombrement des neurites en fonction des différents traitements abondent dans le même sens (fig. 3.12B). Les neurones témoins affichent une moyenne de 46 neurites par champ optique (grossissement 100X). Lorsqu'il y a neuroaggrégation en présence de CP, ce nombre diminue drastiquement d'un peu plus de 10 fois. Les neurones cultivés en présence des inhibiteurs SBTI et aprotinine uniquement montrent une augmentation de deux fois du nombre de neurites comparativement aux témoins. En présence simultanée de SBTI/aprotinine et de CP, la quantité de neurites est comparable aux neurones sans traitement.

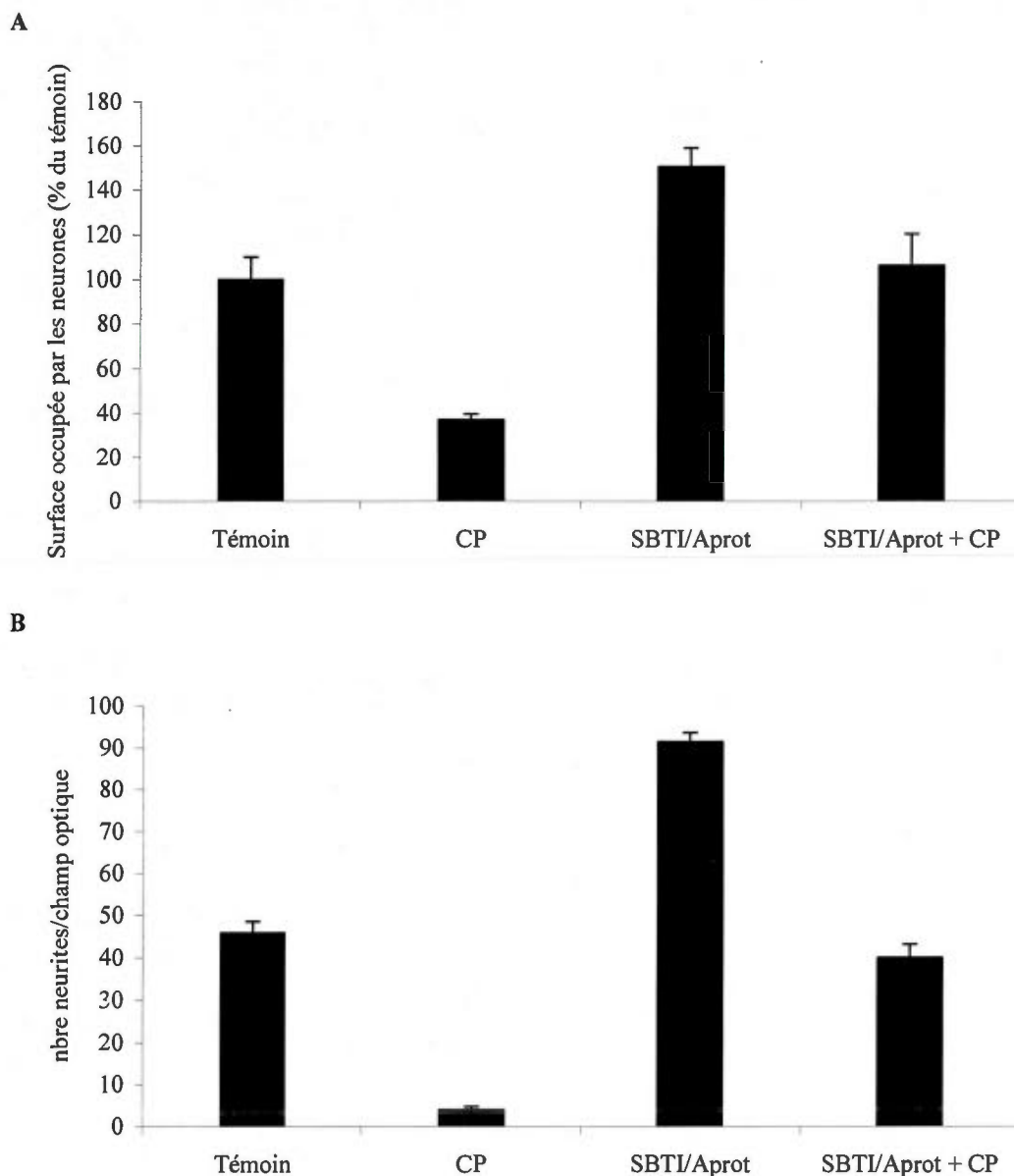


Figure 3.12 Caractérisation morphologique de la neuroagrégation induite par la CP, en présence ou non des inhibiteurs de protéases. Les neurones ont été traités tel que décrit dans la figure 3.10. La surface occupée par les neurones (A), de même que le décompte du nombre de neurites (B), déterminé en fonction de la quantité de projections déployées à partir des neurones, ont été mesurés à partir de clichés obtenus à un grossissement de 100 X. Les résultats (moyennes \pm écarts moyens) correspondent à des observations effectuées lors de deux expériences indépendantes, pour un total de 6 clichés représentatifs par condition.

3.3.2 Analyse de la CP comme cible d'action potentielle des protéases

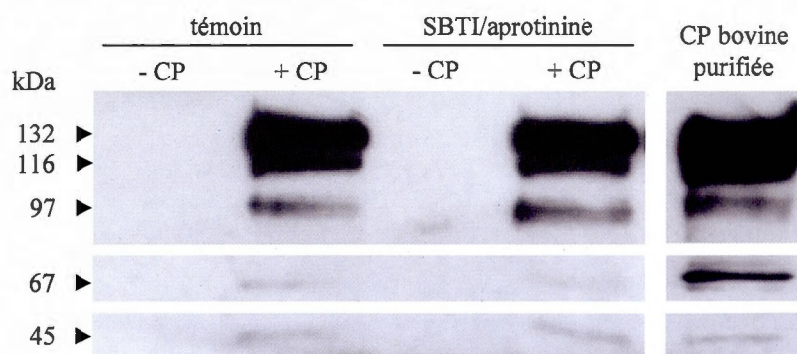
Les résultats morphologiques qualitatifs et quantitatifs indiquent l'implication d'une protéase dans l'action neuroagréative de la CP, puisque la présence des inhibiteurs SBTI et aprotinine empêche cette action. Une première idée posée a été que cette action protéolytique soit directement dirigée sur la CP, ce qui pourrait entraîner son clivage. Afin de valider cette hypothèse, les milieux neuroconditionnés des différents traitements appliqués aux neurones P19 ont été recueillis 48 h après le début des traitements et ont été analysés par immunobuvardage avec l'anticorps anti-CP pour vérifier le patron protéique de la CP. Les résultats présentés à la figure 3.13A montrent que les patrons de la CP, en présence ou non des inhibiteurs de protéases SBTI/aprotinine, ne varient pas. On observe que l'intensité relative des bandes associées à la CP native et à ses fragments principaux, soient 132, 116, 97, 67 et 45 kDa, est la même pour tous les traitements et ressemble à celle obtenue avec une préparation de CP bovine purifiée. L'analyse densitométrique (fig.3.13B) corrobore cette observation. Ce résultat indique que la CP ne serait pas la cible de la ou des protéases impliquées dans la neuroagrégation.

3.3.3 La CP modifie le profil protéique de la reeline

Les inhibiteurs SBTI et aprotinine, qui empêchent l'action agrégative de la CP sur les neurones, sont des inhibiteurs de protéases à sérine et sont de trop grande taille moléculaire pour être capables d'entrer dans les cellules. Ainsi, la protéase impliquée dans l'action neuroagréative de la CP serait 1) une protéase à sérine et 2) accessible extracellulairement, donc sécrétée par les neurones ou présente à leur surface. Parmi les protéases qui peuvent intervenir dans un processus de migration cellulaire et répondant aux caractéristiques énumérées ci-dessus, l'une d'entre elles a été retenue : la reeline. Les publications à ce jour n'ont pas encore rapporté la présence de la reeline dans le modèle P19, autre élément justifiant l'intérêt de porter les recherches sur cette protéase et de vérifier son implication dans le phénomène neuroagréatif médié par la CP.

Les milieux neuroconditionnés ont été récupérés à la fin des 48 h des différents traitements appliqués aux neurones P19, puis analysés par électrophorèse et immunobuvardage anti-reeline. La figure 3.14A présente les autoluminogrammes résultants. À titre de référence de l'expérience, des extraits de cerveaux de rats adultes et de nouveau-nés ont également été analysés. La reeline native (400 kDa) et ses deux principaux fragments de 300 et 180 kDa étaient présents dans les extraits de cerveaux adultes et de nouveau-nés. Les milieux neuroconditionnés des neurones P19 non traités

A



B

		Intensité des bandes (unités arbitraires)				
		132 kDa	116 kDa	97 kDa	67 kDa	45 kDa
Étude 1	CP	43,9	42,0	36,8	31,4	27,0
	CP + inh.prot.	46,7	45,2	40,9	34,6	31,4
Étude 2	CP	41,4	44,3	39,2	33,6	26,3
	CP + inh. prot.	44,8	46,6	43,5	30,7	29,9

Figure 3.13 Profil protéique de la CP dans le milieu neuroconditionné P19. **A** Les milieux neuroconditionnés ont été récoltés 48 h (J6) après le début des différents traitements appliqués aux neurones P19 *in vitro*. Des aliquotes des milieux (correspondant à 0,5 µg de CP) ainsi que 0,5 µg de la préparation de CP plasmatique bovine ont été analysés par électrophorèse SDS-PAGE (10% acrylamide) et immunobuvardage anti-CP. Les complexes immuns ont été révélés par chimioluminescence. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) des principaux fragments de la CP. L'autoluminogramme est représentatif de deux expériences indépendantes. **B** Analyse densitométrique des profils protéiques de la CP.

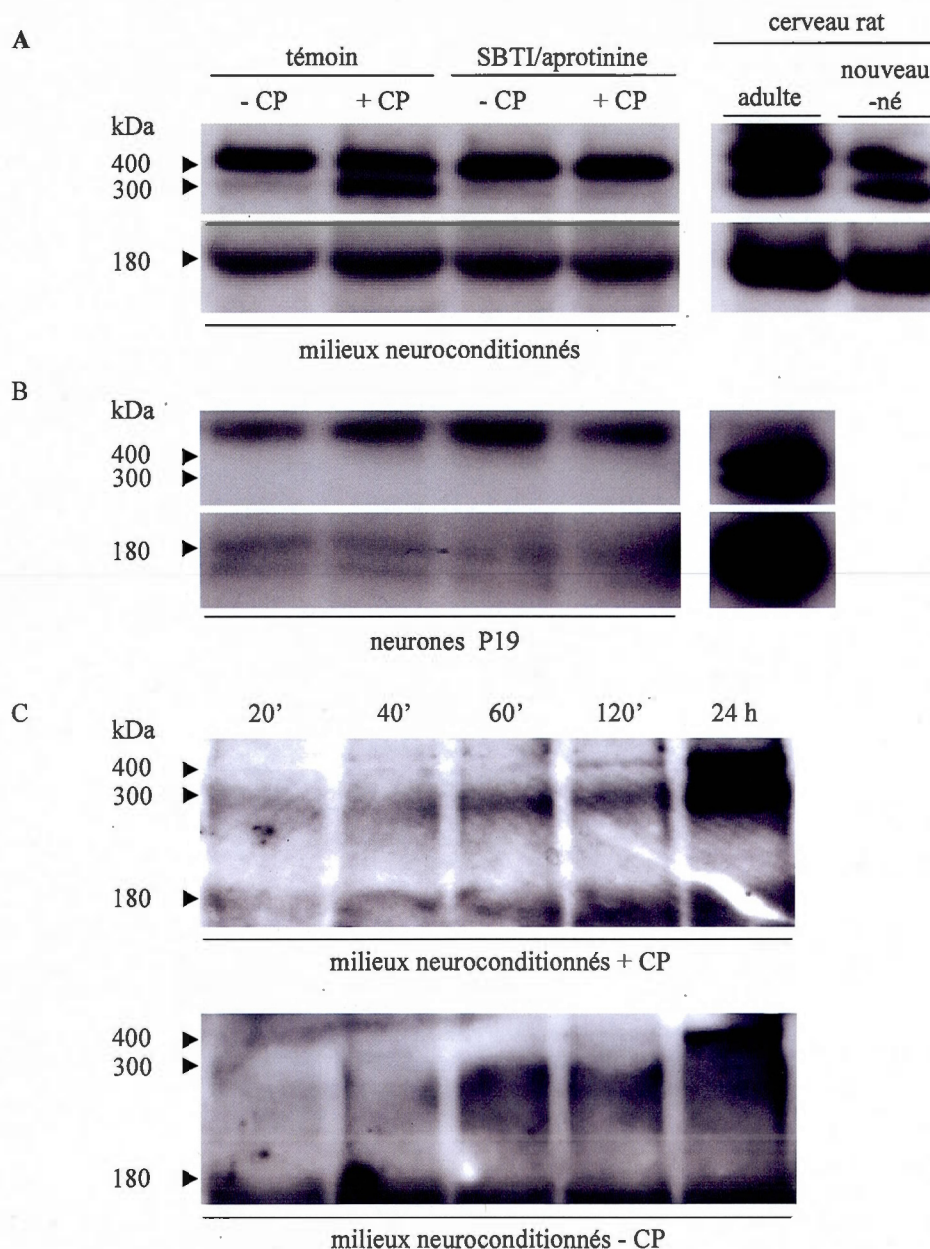


Figure 3.14 La CP modifie le profil protéique de la reeline. Les milieux neuroconditionnés de même que les neurones ont été récupérés après 48 h (J6) d'exposition aux différents traitements. Trente μ L de milieu neuroconditionné de chacun des traitements, 20 μ g de lysat cellulaire, ainsi que 10 μ g des extraits totaux de cerveaux de rats adultes et nouveau-nés ont été analysées par électrophorèse SDS-PAGE (6% acrylamide) et immunobuvardage anti-reeline. Les complexes immuns ont été révélés par chimioluminescence. Les nombres à gauche de la figure correspondent au poids moléculaire (kDa) des protéines détectées. Les autoluminogrammes sont représentatifs de deux expériences indépendantes. **A** Profil de la reeline dans les milieux neuroconditionnés. **B** Profil de la reeline dans les neurones. **C** Cinétique de l'expression de la reeline dans les milieux neuroconditionnés avec et sans CP.

(témoin) ou traités avec SBTI et aprotinine présentent deux des trois bandes associées à la reeline, celles de 400 et 180 kDa. Dans les milieux contenant la CP (i.e. lorsqu'il y a neuroaggrégation), les trois bandes sont détectées, soit à 400, 300 et 180 kDa. De façon intéressante, les inhibiteurs SBTI et aprotinine inhibent la génération du fragment de 300 kDa par la CP.

Le profil protéique de la reeline a également été analysé dans les extraits de neurones, récupérés au même moment que les milieux neuroconditionnés, pour les différents traitements (fig 3.14B). Dans tous les cas, la forme de plus de 400 kDa est prédominante. Il est possible que le degré de glycosylation de la protéine et/ou l'existence d'une forme précurseur puissent expliquer cette taille supérieure. Il est à noter que la taille rapportée dans la littérature pour la reeline pleine longueur varie de 400 à 450 kDa (Jossin *et al.*, 2004). Néanmoins, les résultats montrent que les formes de 180 et 300 kDa de la reeline sont exclusivement produites dans le milieu extracellulaire, dont celle de 300 kDa seulement en présence de la CP.

Finalement, une étude portant sur la cinétique de l'expression protéique de la reeline dans le milieu de culture a été réalisée (fig 3.14C). Les milieux neuroconditionnés ont été récupérés à différents temps, soient à 20, 40, 60 et 120 min, et 24 h après le début des traitements en présence ou non de la CP. L'autoluminogramme montre qu'en présence de la CP dans le milieu de culture, les formes de 300 et 180 kDa de la reeline apparaissent en moins de 20 min, puis vont en augmentant jusqu'à 24 h du début du traitement (le dernier temps analysé). Il est possible que la reeline, une fois excrétée dans le milieu contenant la CP, soit immédiatement clivée pour générer la forme de 300 kDa. Cela expliquerait que la forme de 400 kDa ne puisse s'accumuler dans le milieu dès le début du traitement. En effet, la forme 400 kDa n'apparaît qu'au-delà de 2 h de traitement. Dans les milieux neuroconditionnés sans CP, seule la forme de 400 kDa apparaît dans les premières 24 h de culture.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Le développement du cerveau nécessite une organisation finement régulée du système nerveux. La neuromigration, mécanisme essentiel du développement neuronal embryonnaire, fait appel à plusieurs molécules dont des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidage ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Les travaux récents publiés par les équipes des Drs Paquin et Mateescu ont démontré que la CP peut induire l'agrégation de neurones nouvellement différenciés de cellules souches embryonnaires P19 et ceci constitue une nouveauté. Cette action soulève la possibilité d'un rôle de la CP dans l'organisation architecturale du système nerveux en développement. En considérant le support que la CP pourrait apporter aux fonctions neuronales, ainsi que son expression dans le cerveau, le présent travail a tenté d'explorer le ou les mécanismes de cette action de la CP, en proposant l'implication d'une protéine de liaison spécifique pour la CP et/ou l'action de protéase. Les résultats ont montré que (1) la CP pouvait être immobilisée sur l'agarose de façon à conserver son intégrité structurale et fonctionnelle, (2) des protéines pouvaient être retenues sur la CP-agarose, incluant une protéine de 48 kDa de lysats de neurones P19 et différentes protéines de lysats de cerveau, (3) le SBTI et l'aprotinine inhibent la neuroagrégation induite par la CP, indiquant l'intervention d'une ectoprotéase à sérine dans ce phénomène, (4) la CP n'est pas une cible de cette protéase, et (5) la reeline est sécrétée par les neurones P19 et est clivée dans le phénomène de neuroagrégation induite par la CP. Compte tenu du rôle bien établi de la reeline dans la neuromigration développementale et de l'expression de la CP dans le cerveau, l'ensemble du travail suggère que l'action neuroagréative de la CP *in vitro* aurait un lien avec la neuromigration.

4.1 Dosage oxydasique et caractéristique du matériel chromatographique

Le présent travail a permis dans un premier temps d'optimiser les conditions du dosage de l'activité oxydasique de la CP et de caractériser le support chromatographique CP-agarose utilisé avec l'objectif d'isoler une protéine de liaison spécifique de la CP. Les résultats ont montré que le changement de conditions du dosage de l'activité oxydasique de la CP permet d'économiser appréciablement la quantité de CP. L'optimisation des conditions du dosage de l'activité oxydasique a aussi démontré que les ions K^+ et un pH neutre sont bénéfiques pour l'activité de la CP. Ce résultat appuie une étude antérieure qui rapporte que l'affinité de la CP pour les ions K^+ est effectivement supérieure à celle pour les ions Na^+ (Musci *et al.*, 1996). Le dosage des protéines confirme que la CP se lie très bien aux billes

de CNBr-Sepharose®. Ce résultat est en accord avec le profil chromatographique et électrophorétique de la CP-agarose témoin, qui montre clairement que le conditionnement et les conditions d'élution subséquentes appliqués sur la colonne n'entraînent pas le décrochage de la protéine. Non seulement la CP a été bien couplée aux billes, elle conserve une activité enzymatique appréciable ($\approx 60\%$) et qui est stable dans le temps (perte d'activité d'environ 3%/mois sur une période de dix mois). Le recouvrement de 60% de l'activité enzymatique démontre que l'immobilisation de la CP sur agarose préserve l'intégrité de la protéine, puisque la CP traitée dans les mêmes conditions que pour le couplage mais sans ajout des billes d'agarose a perdu plus de 80% de son activité initiale. Également, la couleur bleue conférée aux billes de CP-agarose témoigne de l'effet stabilisateur et protecteur du couplage sur la protéine. À notre connaissance, une telle observation n'avait pas été rapportée auparavant pour la CP.

À ce propos, il est à noter que ce type de support chromatographique est couramment utilisé pour immobiliser efficacement différents ligands protéiques. Une étude récente de réticulation de l'alcalse (≈ 43 kDa) à l'agarose rapporte une stabilité du matériel résultant ainsi que la conservation de plus de 50 % de l'activité catalytique de la protéine libre (Tardioli *et al.*, 2003). De même, des études réalisées sur le couplage de la lipogénase de la fève de soya aux billes de CNBr-Sepharose® ont montré, outre une bonne stabilité du couplage et de l'activité enzymatique de la protéine immobilisée, que le temps de demi-vie de l'enzyme augmente de 20 fois lorsque réticulée à l'agarose, dans des conditions optimales de tampon et à pH physiologique (Chikere *et al.*, 2001).

4.2 Interaction de la CP-agarose avec des protéines d'extraits cellulaires

Il est démontré qu'au cours de la corticogénèse, les neurones migrent pour former les différentes couches neuronales du cortex cérébral. Cette migration s'effectue le long des fibres gliales selon un mécanisme qui demeure encore obscur (Nadarajah et Parnavelas, 2002). Il est toutefois proposé que les neurones puissent reconnaître des facteurs (substrats) impliqués dans le mécanisme migratoire et qu'ils y adhèrent par différents récepteurs exprimés à la surface neuronale (Nadarajah et Parnavelas, 2002). Les recherches menées dans le laboratoire portant sur l'effet neuroagréatif de la CP suggèrent que la neuroaggrégation observée *in vitro* puisse être le reflet de la neuromigration *in vivo*, et que ce phénomène pourrait impliquer des récepteurs de la CP à la surface des neurones de sorte que les neurones pourraient lier la CP ancrée à la membrane des cellules gliales par un groupement GPI (Maltais *et al.*, 2003). Dans ce contexte, nous avons mis au point une matrice chromatographique (CP-

agarose) pour tenter de purifier d'éventuelles protéines de liaison de la CP à partir de divers extraits cellulaires, dans l'optique de les caractériser.

La chromatographie d'un extrait de protéines membranaires d'érythrocytes bovins sur CP-agarose a permis de montrer qu'il est possible de retenir des protéines sur ce type de matrice. Ainsi, une protéine de 30 kDa a été éluée avec 0,5 M KCl. Cette protéine pourrait être le monomère de la glycophorine tel que rapporté par Stern et Frieden (1993). La glycophorine existe aussi sous forme dimérique, laquelle n'a pu être observée dans le présent travail. L'électrophorèse ayant été faite en conditions dénaturantes et réductrices (i.e. présence de SDS et β -mercaptoéthanol), il est possible que la forme dimérique ait été dénaturée. Cette étude pourrait être reprise en optant pour une électrophorèse non-dénaturante et non-réductrice, favorisant la stabilité du dimère. L'identification de la glycophorine pourrait être vérifiée par immunobuvardage puisqu'il existe des anticorps anti-glycophorine disponibles commercialement. Les travaux de Puchkova *et coll.* (1990) sur la purification du récepteur érythrocytaire de la CP, qui fait appel sensiblement à la même procédure expérimentale que celle utilisée dans ce travail, mentionne que ce récepteur est élué de la colonne de CP-agarose avec 2.2 M NaCl dans un tampon 20 mM KPi, 0,1% Tween-20 après un lavage avec 0,5M NaCl. Dans la présente étude, la protéine de 30 kDa a été désorbée avec 0,5 M KCl dans le même tampon, possiblement en relation avec une meilleure affinité de la CP pour l'ion K^+ que pour l'ion sodium.

Une protéine de 48 kDa a pu être retenue sur CP-agarose à partir de lysats de neurones P19. Cependant, le rendement est très faible et la chromatographie devrait être réalisée à plus grande échelle pour mieux caractériser cette protéine. Contrairement aux résultats obtenus avec le lysat neuronal, plus d'une protéine d'extrait de cerveau de rat a été retenue sur CP-agarose. L'une de ces protéines, celle de 45 kDa, est reconnue par un anticorps anti-CP et proviendrait de la fragmentation de la CP immobilisée sur la colonne puisque l'extrait de cerveau a été déplété de la CP endogène avant la chromatographie sur CP-agarose. Une protéase présente dans l'extrait pourrait être impliquée dans le clivage de la CP immobilisée. Des inhibiteurs de protéases avaient été ajoutés dès le début de l'extraction pour éviter la protéolyse mais il se peut que le dépôt en boucle de l'extrait sur la colonne pendant 18 h ait permis à l'activité protéolytique de se manifester et ce, même à de faibles niveaux. Cette méthode de dépôt, adoptée pour favoriser l'interaction entre la CP et des protéines de liaison, pourrait être révisée.

La CP est une protéine dont les fragments sont difficilement séparables autrement que dans des conditions rigoureuses telles que la présence de SDS ou d'urée (8 M) (Ortel *et al.*, 1983). De plus, les fragments auraient tendance à se réassocier lorsque l'agent est retiré. Il serait donc possible de penser qu'une variante de la méthode utilisée dans ce travail, i.e. le passage d'une protéase sur CP-agarose, soit une alternative intéressante pour obtenir spécifiquement certains fragments de la CP en absence d'agent dénaturant. Dans le cas présent, l'obtention spécifique du fragment de 45 kDa de la CP permettrait peut-être d'étudier ce fragment et de déterminer s'il a une fonction biologique similaire à celle de la CP native, comme par exemple la capacité d'induire l'agrégation des neurones P19 (voir section 4.3).

Il est possible de faire deux autres remarques sur les résultats de chromatographie. D'abord, l'élution avec une force ionique de 0,15M KCl est généralement faite dans le but d'éliminer les protéines interagissant de façon non spécifique avec la colonne, ce qui signifierait que les bandes observées ne soient pas de réel intérêt comme potentiel récepteur de la CP. D'autre part, il est possible que la CP endogène de l'extrait de cerveau de rat ait initialement complexé le récepteur (protéine de liaison) et que ce complexe ait été retenu sur AE-agarose. Toutefois, l'analyse électrophorétique avec coloration au nitrate d'argent des fractions éluées de la colonne AE-agarose ne semble pas montrer la présence de protéine(s) ayant pu être co-purifiée(s) avec la CP, à tout le moins pour des tailles moléculaires en deçà de 200 kDa (résultat non montré). Il est possible qu'une protéine de plus haut poids moléculaire interagisse avec la CP, ce qui justifierait l'intérêt d'analyser les fractions chromatographiques en utilisant des gels d'électrophorèse de plus grande porosité.

Lorsqu'un extrait de protéines totales de lysat neuronal P19 a été chromatographié sur CP-agarose en vue de mettre en évidence un récepteur neuronal de la CP, quelques protéines ont été retenues sur la colonne et éluées à 0,15M KCl, avec des tailles moléculaires variant de 35 à 65 kDa, et de 87 à 126 kDa. Une protéine unique de 48 kDa a été éluée à 0,5M KCl, ce qui en ferait une candidate intéressante comme récepteur. Cette protéine, qui présente un faible poids moléculaire, pourrait être une sous-unité du récepteur de la CP considérant que le récepteur érythrocytaire de la CP est un assemblage de sous-unités. Des études électrophorétiques faites en conditions non-dénaturantes pourraient permettre de détecter des protéines de liaison à la CP qui auraient une taille moléculaire plus élevée. Toutefois, les protéines éluées dans le présent travail pourraient n'avoir qu'une interaction non-spécifique avec la colonne. Il est à noter que des études de buvardage de type ligand avec de la CP marquée à la DIG et un anticorps anti-DIG ont été faites sur des extraits de lysat neuronal P19 en vue de mettre en évidence une ou des protéines ayant une interaction avec la CP. Cependant, en raison de

difficultés d'ordre technique, cette méthode n'a pu se révéler concluante.

L'analyse de lysat neuronal P19 sur CP-agarose mérite d'être reprise, d'une part en disposant d'une plus grande quantité de lysat et/ou en utilisant une fraction enrichie en protéines membranaires. Afin d'optimiser les chances de purifier un récepteur neuronal de la CP, il pourrait être de mise de récolter les neurones 24 ou 48 h après avoir ajouté la CP dans le milieu de culture pour induire la neuroaggrégation. Si récepteur il y a, il pourrait être particulièrement exprimé à la surface des neurones en aggrégation, ce qui augmenterait les chances de purifier un récepteur par chromatographie sur CP-agarose.

En somme, les résultats tirés de la méthode de chromatographie sur CP-agarose ont permis d'observer pour les érythrocytes une protéine de liaison à la CP, d'une taille moléculaire semblable à celle rapportée dans la littérature, mais n'a pas permis d'affirmer l'existence d'un récepteur neuronal spécifique à la CP, que ce soit à partir de neurones P19 ou de l'extrait de cerveau de rat. Quelques protéines de tailles moléculaires variées semblent interagir plus ou moins avec la CP-agarose. Les études réalisées il y a plus de 20 ans avec une méthode de purification semblable à celle utilisée dans ce travail ont également rapporté la détection de peptides de différentes tailles moléculaires qui n'ont pas été caractérisés plus avant en terme de récepteurs (se référer au tableau 1.2). L'identité, de même que la caractérisation des récepteurs de la CP demeurent donc peu documentées. L'équipe de Sasina *et coll* (2000) a rapporté avoir isolé, cloné puis caractérisé partiellement le récepteur humain de la CP. Cette équipe a publié la séquence des acides aminés 216 à 427 du récepteur et montré une forte homologie avec la séquence des domaines 2 et 3 de la CP humaine elle-même. Toutefois, une recherche sur NCBI («National Center for Biotechnology Information») nous a permis de constater que la séquence 216 à 427 de ce récepteur humain cloné est identique à quelques acides aminés près à la séquence en acides aminés de la CP de rat (# de référence : NM_012532.1). En fait, l'homologie de séquence du récepteur humain est encore plus grande avec la CP de rat qu'avec la CP humaine. Considérant que le récepteur humain et la CP humaine ont le même poids moléculaire et le même profil protéolytique (Sasina *et al.*, 2000), nous avons des doutes sur le fait que la protéine clonée représente bien un récepteur de la CP.

Il existe beaucoup de difficultés relativement à la purification de protéines membranaires. Il est difficile de prévoir les conditions optimales permettant d'isoler un récepteur, dans le cas présent le récepteur neuronal de la CP. Néanmoins, des modifications dans l'approche expérimentale utilisée pourraient permettre d'améliorer la méthode de purification. Par exemple, il serait pertinent de tester

différents types de détergents lors de l'extraction des protéines à partir de tissus. En effet, l'optimisation des conditions de solubilisation des protéines membranaires pour un type de tissu donné demeure la clé du succès dans la purification de protéines par chromatographie. La performance d'un détergent dans l'extraction et l'analyse de protéines membranaires dépend de plusieurs facteurs qui sont généralement difficiles à prévoir. Dans la présente étude, le recours au Triton X-100 a été motivé d'abord parce que les études portant sur la purification du récepteur de la CP ont utilisé ce détergent. De plus, il s'agit d'un détergent de type non-ionique couramment employé pour la purification de protéines car il permet un haut rendement d'extraction de protéines (Banerjee *et al.*, 1995; Churchward *et al.*, 2005). Toutefois, il est connu que le degré de solubilisation des lipides est un facteur déterminant dans le maintien de l'activité biologique des protéines extraites. Une étude comparative menée sur un éventail de détergents a montré que les détergents de type zwitterionique comme le CHAPS ou le CHAPSO, qui présentent des ratios de solubilisation lipide/protéine d'environ 10 fois supérieurs à celui du Triton, favorisent un bon recouvrement de l'activité biologique de protéines membranaires telles que les récepteurs (Banerjee *et al.*, 1995). En augmentant le niveau de conservation de l'activité biologique des protéines, on favorise du même coup le maintien de leur structure tridimensionnelle qui est plus souvent qu'autrement essentielle dans les interactions ligand protéique-récepteur. Ainsi, on potentialise les interactions spécifiques entre la CP et ses récepteurs potentiels. Des études de co-immunoprécipitation avec l'anticorps anti-CP pourraient aussi être tentées après avoir vérifié que l'anticorps peut immunoprécipiter la CP.

4.3 Forme de la CP dans les tissus

Il est connu que la CP plasmatique se présente majoritairement sous la forme 132 kDa par électrophorèse, la taille moléculaire native de la protéine. C'est aussi la taille moléculaire apparente de la CP-GPI exprimée à la surface de cellules de glioblastome C6 (Patel et David, 1997). On rapporte une forte similitude de la taille de la CP native entre les espèces animales, y compris l'humain. Toutefois, les études portant sur les facteurs susceptibles d'influencer l'expression de la CP dans divers tissus de l'organisme ne se sont jamais attardées à l'étude de fragments de la CP. Dans les résultats présentés, deux préparations de CP ont été analysées et il est à même de constater que le patron protéique de la CP plasmatique est identique entre la CP bovine et la CP de rat. Toutefois, nos observations portent à croire que la taille moléculaire de la CP peut différer selon sa localisation dans l'organisme. Les résultats ont montré que chez le rat, la forme native de la CP est prépondérante dans le plasma alors qu'une forme immunoréactive de 45 kDa semble prédominer dans les extraits de cerveau. Ce résultat a d'ailleurs été reproduit à partir d'au moins trois préparations différentes et

fraîches de protéines totales de cerveau de rat. Il est connu que la CP possède des sites sensibles à l'action protéolytique, ce qui peut engendrer des fragments de différentes tailles moléculaires (Takahashi *et al.*, 1984). Quelques-uns de ces principaux fragments, soit 116, 97, 67 et 45 sont d'ailleurs visibles par électrophorèse et immunobuvardage, à partir de préparations de CP de bœuf et de rat. C'est pour cette raison qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été ajouté immédiatement après la collecte du tissu, avant l'étape d'homogénéisation. À la lumière de ces observations, il est possible de penser qu'un ou des fragments de la CP pourraient avoir une ou des fonctions biologiques. Dans le cerveau, la fragmentation pourrait se produire sur la CP-GPI ancrée à la membrane des cellules. Pour compléter nos résultats sur les formes cérébrales de la CP, les homogénats de cerveau pourraient être traités avec de la phospholipase C afin de libérer la portion CP de la CP-GPI et d'en analyser la taille.

Une étude récente rapporte que la biosynthèse ainsi que la distribution de la CP est dépendante de l'âge chez le rat (Platonova *et al.*, 2004). Il a été démontré par des études de PCR (« polymérase chain reaction ») chez des rats âgés de 7 jours que de l'ARNm de la CP est synthétisé dans le cerveau et code pour la CP munie de l'ancre GPI, ainsi que la forme soluble de la protéine. À l'âge adulte, la concentration sérique de la CP de même que celle de son activité oxydasique augmentent, alors que le contenu en CP dans le liquide cébrospinal demeure bas. Il est également démontré que la concentration en cuivre dans ces deux liquides change de la même façon selon l'âge (Platonova *et al.*, 2004). Il est possible de penser que d'autres caractéristiques de la CP, comme la quantité relative de ses fragments, puissent également varier au cours du développement. Des fragments de la CP, tels que ceux détectés dans les extraits de cerveau, pourraient avoir une activité biologique au même titre que la CP native. Par exemple, des fragments de la CP pourraient avoir une action particulière dans le contexte de la neuromigration qui se produit lors du développement du cerveau. À cet égard, il pourrait être très intéressant de vérifier dans le modèle *in vitro* si des fragments de la CP peuvent induire, tout comme la CP native, la neuroaggrégation. Quoi qu'il en soit, cette différence marquée de la taille de la CP en fonction de sa localisation dans l'organisme mérite d'être investiguée davantage puisqu'une telle observation n'a pas été rapportée dans la littérature.

4.4 Implication d'une activité protéolytique dans l'action neuroagrégate de la CP

Nos expériences ont permis d'entrevoir qu'une voie métabolique impliquant une activité protéolytique semblerait être impliquée dans le phénomène de neuroaggrégation. Lorsque des neurones sont incubés en présence de la CP, ces derniers vont former des agrégats dans un délai de 24-48 h. Toutefois, l'ajout simultané de SBTI et d'aprotinine dans le milieu de culture, en présence de la CP, empêche les neurones de former des agrégats. En considérant que le SBTI et l'aprotinine ne pénètrent pas dans les cellules, une protéase dont le domaine catalytique est extracellulaire (protéase sécrétée ou ectoprotéase membranaire) serait impliquée dans la neuroaggrégation.

Une première cible envisagée pour cette protéase était la CP elle-même, compte tenu de la détection d'un fragment de la CP dans les extraits de cerveau. De plus, il a été démontré que la fragmentation de la CP plasmatique, *in vivo*, est le résultat d'un clivage protéolytique (Ryden, 1971). Une autre étude a rapporté qu'une métalloprotéase plasmatique peut être co-purifiée avec la CP et ainsi provoquer une dégradation protéolytique de la CP (Ehrenwald et Fox, 1994). À cet égard, des expériences effectuées dans le but de détecter une activité protéolytique dans nos préparations de CP bovine purifiée ont montré une activité protéolytique nulle et ce, pour différentes préparations (résultats non montrés). Bien que les profils électrophorétiques montrent que la préparation de CP plasmatique contient de faibles pourcentages de fragments de la CP, ceux-ci proviennent probablement du plasma de départ. Dans les expériences de neuroaggrégation avec le modèle P19, les résultats ont montré que le profil protéique de la CP ne change pas dans les milieux de culture additionnés de CP, avec ou sans les inhibiteurs. Ceci indique donc que la CP n'est pas la cible de l'activité protéolytique qui semble reliée au phénomène neuroaggrégatif.

Parmi les protéases à sérine connues à ce jour, l'une d'entre elles, la reeline, présente une caractéristique additionnelle et pertinente par le fait qu'elle est reconnue pour être impliquée dans la neuromigration. Le présent travail a révélé trois faits intéressants : 1) Les neurones P19 produisent la reeline, ce qui n'avait pas été rapporté auparavant. Ce résultat s'accorde avec le fait que les cultures P19 contiennent des neurones GABAergiques (MacPherson et Mc Burney, 1995) et que la reeline est produite entre autres par ce type de neurones *in vivo* (Scotti et Herrmann, 2002); 2) Les neurones P19 nouvellement différenciés expriment les formes de 400 et 180 kDa de la reeline alors qu'une forme supplémentaire de 300 kDa existe dans les extraits de cerveaux de rats adultes et de nouveau-nés (Fatemi *et al.*, 2005; Botella-Lopez *et al.*, 2006). Ce résultat suggère une intervention régulée de fragments de la reeline dans le développement du cerveau; 3) Le traitement des neurones P19 avec la

CP induit la génération du fragment de 300 kDa en même temps qu'il provoque la neuroagrégation, suggérant l'existence d'une interrelation entre les deux phénomènes. Le fait que ces deux phénomènes sont inhibés par le SBTI et l'aprotinine apporte un appui supplémentaire à l'hypothèse.

Il existe encore peu de connaissances sur les relations structure-fonction de la reeline de même que sur l'identité de ses substrats. Une étude a montré que c'est la portion centrale de la reeline qui est nécessaire, voire suffisante, pour assurer son rôle durant le développement cortical (Jossin *et al.*, 2004). Le fragment de 300 kDa, qui est notamment obtenu lors de la neuroagrégation, est rapporté comme ayant conservé cette région centrale de la séquence peptidique en plus de la partie N-terminale (Jossin *et al.*, 2003). Il est donc possible que ce fragment de 300 kDa, biologiquement fonctionnel, ait un rôle dans la neuromigration, suggérant une relation directe ou indirecte, entre la reeline, la CP et le phénomène neuroagréatif. Des interrogations demeurent à propos de la fragmentation de la reeline, à savoir si elle est due à une auto-protéolyse ou encore produite par une autre protéase.

Plusieurs publications portant sur la reeline soulignent son rôle dans le développement du système nerveux et particulièrement lors de la migration des neurones (Kim *et al.*, 2002). Également sont bien documentées certaines voies de signalisation activées par la reeline. Trois récepteurs membranaires auxquels la reeline peut se lier sont connus : les récepteurs lipoprotéiques ApoER2 et VLDLR ainsi que le récepteur $\alpha_3\beta_1$ -intégrine. Lorsque la reeline se lie à l'un de ces trois récepteurs, elle induit le recrutement de la protéine adaptatrice cytosolique Dab-1 qui est dès lors oligomérisée puis phosphorylée. La phosphorylation de Dab-1 est essentielle pour assurer la fonction de la reeline dans l'organisation des couches de neurones dans le cortex en développement (Jossin *et al.*, 2004). Les protéines Fyn et Src, toutes deux appartenant à la famille des tyrosine kinases, sont également impliquées dans la phosphorylation de Dab-1, probablement en interagissant via leur domaine de liaison SH2 (Jossin *et al.*, 2004). Dans la poursuite de ces travaux, il serait intéressant de vérifier s'il existe une corrélation entre le phénomène neuroagréatif induit par la CP et la voie de signalisation cellulaire induite par la reeline qui mène à la phosphorylation de Dab-1, ce qui viendrait soutenir l'hypothèse de l'implication de la reeline dans le phénomène induit par la CP.

Il existe un anticorps, le CR-50, qui reconnaît spécifiquement un épitope de la reeline au niveau de la partie N-terminale (Jossin *et al.*, 2004). Cette région de la reeline est considérée importante du point de vue expérimental car lorsque l'anticorps CR-50 s'y lie, il bloque du même coup la fonction biologique de la reeline. Le CR-50 empêche l'interaction de la reeline avec ses récepteurs, possiblement de manière stérique, ce qui conduit à une inhibition de la phosphorylation de Dab-1

(Jossin *et al.*, 2003). Dans cette perspective, il serait pertinent de vérifier si l'ajout du CR-50 dans le milieu de culture des neurones contenant la CP empêche 1) la phosphorylation de Dab-1; 2) la génération du fragment de 300 kDa de la reeline et 3) le phénomène neuroagréatif normalement induit par la CP. Ces études pourraient certainement apporter de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre les liens entre la CP, la reeline et la neuroagrégation.

Des chercheurs ont soulevé l'hypothèse que la reeline agisse sur la migration neuronale lors de la corticogenèse via son activité protéase à sérine (Maurin *et al.*, 2004). Les substrats de cette activité n'ont pas été clairement identifiés mais pourraient inclure des récepteurs. Cette possibilité pourrait rallier les deux hypothèses voulant que l'action neuroagréative de la CP soit à la fois dépendante d'un récepteur neuronal et de l'action d'une protéase. À ce propos, une étude portant sur le récepteur érythrocytaire de la CP suggère que le clivage de ce récepteur serait nécessaire pour la liaison avec la CP (Puchkova *et al.*, 1990). De même, les études menées sur le récepteur fibroblastique de la CP suggèrent également l'implication d'une action protéolytique sur ce récepteur pour permettre son interaction avec la CP. Il est même rapporté que la dégradation protéolytique du récepteur puisse être inhibée par des inhibiteurs de protéases à sérine (Sasina *et al.*, 1998).

CONCLUSION

Les connaissances portant sur le développement du cerveau au cours de l'embryogenèse indiquent que les mécanismes essentiels du développement neuronal, comme la neuromigration, dépendent de plusieurs molécules dont des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion cellulaire et de guidance ainsi que des composantes de la matrice extracellulaire. Les travaux récents publiés par les équipes des Drs Paquin et Mateescu soulèvent la possibilité que la CP puisse participer à l'organisation architecturale du système nerveux en développement. Le présent travail a tenté d'explorer le ou les mécanismes par lesquels la CP agit, en proposant l'implication d'une protéine de liaison spécifique pour la CP et/ou l'action de protéase.

Les résultats ont montré que la réticulation de la CP à l'agarose se fait de manière efficace et que l'immobilisation de la CP procure un effet stabilisateur et protecteur sur l'activité enzymatique de la CP, ce qui permet de recouvrer jusqu'à près de 60% de l'activité initiale de la protéine. La CP couplée conserve son activité oxydasique de manière appréciable sur une période allant jusqu'à 10 mois suivant la synthèse. Ces résultats font de la CP-agarose une matrice chromatographique intéressante en vue de purifier des protéines de liaison de la CP.

La chromatographie sur CP-agarose a permis de retenir spécifiquement une protéine de 30 kDa à partir d'extraits de protéines membranaires d'érythrocytes bovins, laquelle pourrait correspondre à la forme monomérique du récepteur érythrocytaire rapporté dans la littérature. Une protéine de 48 kDa provenant de lysat de neurones P19 a été retenue sur CP-agarose mais les résultats ne permettent pas encore de conclure à l'existence de récepteur neuronaux de la CP. Un extrait de cerveaux de rats, déplété de la CP endogène puis chromatographié sur CP-agarose, montre qu'une protéine de 45 kDa est éluée de ce gel et est reconnue par un anticorps anti-CP. Il est possible que la CP immobilisée ait été clivée par une protéase de l'extrait. Alors que la forme native de 132 kDa de la CP est prépondérante dans le plasma, il est intéressant de noter qu'une forme immunoréactive de 45 kDa prédomine dans les extraits de cerveau. Ce résultat soulève ainsi la possibilité que des fragments physiologiques de la CP puissent avoir des rôles biologiques.

L'ajout des inhibiteurs de protéases à sérine SBTI et aprotinine abolit l'agrégation des neurones P19 normalement induite par la CP. Une activité protéasique serait ainsi impliquée dans l'action neuroagréative de la CP. Toutefois, cette activité ne cible pas la CP.

La reeline, une protéine essentielle à la neuromigration et possédant une activité de protéase à sérine, est sécrétée par les neurones P19. Un fragment de 300 kDa de la reeline est généré et ce, uniquement lors de la neuroagrégation induite par la CP. De plus, la génération de ce fragment est inhibée lorsque le traitement avec de la CP est fait en présence du SBTI et de l'aprotinine. Il est possible qu'il existe une relation entre la reeline, la CP et le phénomène neuroagréatif qui mérite d'être investiguée.

BILBIOGRAPHIE

- Al-Timimi, D. J. et Dormandy, T. L. 1977. "The inhibition of lipid autoxidation by human caeruloplasmin". *Biochem J* 168(2): 283-8.
- Aldred, A. R., Grimes, A., Schreiber, G. et Mercer, J. F. 1987. "Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis". *J Biol Chem* 262(6): 2875-8.
- Alessandri, G., Raju, K. et Gullino, P. M. 1983. "Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo". *Cancer Res* 43(4): 1790-7.
- Aouffen, M., Paquin, J., De Grandpre, E., Nadeau, R. et Mateescu, M. A. 2001. "Deglycosylated ceruloplasmin maintains its enzymatic, antioxidant, cardioprotective, and neuronoprotective properties". *Biochem Cell Biol* 79(4): 489-97.
- Askwith, C. et Kaplan, J. 1997. "An oxidase-permease-based iron transport system in *Schizosaccharomyces pombe* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Biol Chem* 272(1): 401-5.
- Atanasiu, R., Dumoulin, M. J., Chahine, R., Mateescu, M. A. et Nadeau, R. 1995. "Antiarrhythmic effects of ceruloplasmin during reperfusion in the ischemic isolated rat heart". *Can J Physiol Pharmacol* 73(9): 1253-61.
- Atanasiu, R., Gouin, L., Mateescu, M. A., Cardinal, R. et Nadeau, R. 1996. "Class III antiarrhythmic effects of ceruloplasmin on rat heart". *Can J Physiol Pharmacol* 74(6): 652-6.
- Atanasiu, R. L., Stea, D., Mateescu, M. A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R. et Rochette, L. 1998. "Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties". *Mol Cell Biochem* 189(1-2): 127-35.
- Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, C. K., Seshadri, V., Tripoulas, N. A. et Fox, P. L. 1999. "Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism". *J Biol Chem* 274(2): 1116-23.
- Banerjee, P., Joo, J. B., Buse, J. T. et Dawson, G. 1995. "Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents". *Chem Phys Lipids* 77(1): 65-78.
- Barnes, G. et Frieden, E. 1984. "Ceruloplasmin receptors of erythrocytes". *Biochem Biophys Res Commun* 125(1): 157-62.
- Baron, P., Gomez-Marin, O., Casas, C., Heil, J., Will, N., Condie, R., Burke, B., Najarian, J. S. et Sutherland, D. E. 1991. "Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury". *J Surg Res* 51(1): 60-5.
- Barrass, B. C., Coult, D. B., Rich, P. et Tutt, K. J. 1974. "Substrate specificity of caeruloplasmin. Phenylalkylamine substrates". *Biochem Pharmacol* 23(1): 47-56.
- Bates, G. W., Workman, E. F. et Schlabach, M. R. 1973. "Does transferrin exhibit ferroxidase activity?" *Biochem Biophys Res Commun* 50: 84-90.
- Berg, D. et Hochstrasser, H. 2006. "Iron metabolism in Parkinsonian syndromes". *Mov Disord* 21(9): 1299-310.
- Berthon, G. 1993. "Is copper pro- or anti-inflammatory? A reconciling view and a novel approach for the use of copper in the control of inflammation". *Agents Actions* 39(3-4): 210-7.
- Bingle, C. D., Fleming, R. E. et Gitlin, J. D. 1993. "Interaction of CCAAT/enhancer-binding protein alpha and beta with the rat caeruloplasmin gene promoter". *Biochem J* 294 (Pt 2): 473-9.
- Boivin, S., Aouffen, M., Fournier, A. et Mateescu, M. A. 2001. "Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI-TOF mass spectrometry". *Biochem Biophys Res Commun* 288(4): 1006-10.
- Botella-Lopez, A., Burgaya, F., Gavin, R., Garcia-Ayllon, M. S., Gomez-Tortosa, E., Pena-Casanova, J., Urena, J. M., Del Rio, J. A., Blesa, R., Soriano, E. et Saez-Valero, J. 2006. "Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease". *Proc Natl Acad Sci USA* 103(14): 5573-8.

- Bowman, B. H. 1993. "Hepatic plasma proteins: mechanisms of function and regulation". Academic Press Inc., San Diego, CA, USA:142-50.
- Cadet, N. et Paquin, J. 2000. "Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons". *Brain Res Dev Brain Res* 120(2): 211-21.
- Calabrese, L., Capuozzo, E., Galtieri, A. et Bellocchio, E. 1983. "Sheep ceruloplasmin: isolation and characterization". *Mol Cell Biochem* 51(2): 129-32.
- Calabrese, L. et Carbonaro, M. 1986. "An e.p.r. study of the non-equivalence of the copper sites of caeruloplasmin". *Biochem J* 238(1): 291-5.
- Calabrese, L., Mateescu, M. A., Carbonaro, M. et Mondovi, B. 1988. "Reexamination of spectroscopic properties of ceruloplasmin freshly isolated with a novel very rapid single-step procedure". *Biochem Int* 16(2): 199-208.
- Chahine, R., Mateescu, M. A., Roger, S., Yamaguchi, N., de Champlain, J. et Nadeau, R. 1991. "Protective effects of ceruloplasmin against electrolysis-induced oxygen free radicals in rat heart". *Can J Physiol Pharmacol* 69(10): 1459-64.
- Cheun, J. E. et Yeh, H. H. 1991. "Differentiation of a stem cell line toward a neuronal phenotype". *Int J Dev Neurosci* 9(4): 391-404.
- Chikere, A. C., Galunsky, B., Schunemann, V. V. et Kasche, V. V. 2001. "Stability of immobilized soybean lipoxygenases: influence of coupling conditions on the ionization state of the active site Fe". *Enzyme Microb Technol* 28(2-3): 168-175.
- Chiu, F. C., Feng, L., Chan, S. O., Padin, C. et Federoff, J. H. 1995. "Expression of neurofilament proteins during retinoic acid-induced differentiation of P19 embryonal carcinoma cells". *Brain Res Mol Brain Res* 30(1): 77-86.
- Chizhikov, V. V. et Millen, K. J. 2004. "Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS". *Nat Rev Neurosci* 5(10): 808-12.
- Churchward, M. A., Butt, R. H., Lang, J. C., Hsu, K. K. et Coorssen, J. R. 2005. "Enhanced detergent extraction for analysis of membrane proteomes by two-dimensional gel electrophoresis". *Proteome Sci* 3(1): 5.
- Cousins, R. J. 1985. "Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin". *Physiol Rev* 65(2): 238-309.
- Curzon, G. 1961. "Some properties of coupled iron-caeruloplasmin oxidation system". *Biochem J* 79: 656-63.
- Curzon, G. et O'Reilly, S. 1960. "A coupled iron-caeruloplasmin oxidation system." *Biochem Biophys Res Commun* 2: 284-86.
- Dancis, A., Roman, D. G., Anderson, G. J., Hinnebusch, A. G. et Klausner, R. D. 1992. "Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 3869-73.
- David, S. et Patel, B. 2000. "Ceruloplasmin: structure and function of an essential ferroxidase". *Adv Struct Biol* 6: 221-37.
- de Mol, N. J. 1985. "Interaction of phenothiazine drugs with human ceruloplasmin. Relation between activation of catecholamine neurotransmitter oxidation and electron donating ability of phenothiazine drugs". *Biochem Pharmacol* 34(15): 2605-9.
- de Silva, D., Davis-Kaplan, S., Fergestad, J. et Kaplan, J. 1997. "Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin". *J Biol Chem* 272(22): 14208-13.
- De Silva, D. M., Askwith, C. C., Eide, D. et Kaplan, J. 1995. "The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase". *J Biol Chem* 270(3): 1098-101.
- de Silva, D. M., Askwith, C. C. et Kaplan, J. 1996. "Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes". *Physiol Rev* 76(1): 31-47.
- Dumoulin, M. J., Chahine, R., Atanasiu, R., Nadeau, R. et Mateescu, M. A. 1996. "Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin". *Arzneimittelforschung* 46(9): 855-61.

- Ehrenwald, E. et Fox, P. L. 1994. "Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of a plasma metalloproteinase". *Arch Biochem Biophys* 309(2): 392-5.
- Evans, G. W. 1973. "Copper homeostasis in the mammalian system". *Physiol Rev* 53(3): 535-70.
- Fatemi, S. H. 2005. "Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia". *Int Rev Neurobiol* 71: 179-87.
- Fatemi, S. H., Snow, A. V., Strydom, J. M., Araghi-Niknam, M., Reutiman, T. J., Lee, S., Brooks, A. I. et Pearce, D. A. 2005. "Reelin signaling is impaired in autism". *Biol Psychiatry* 57(7): 777-87.
- Finley, M. F., Kulkarni, N. et Huettnner, J. E. 1996. "Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells". *J Neurosci* 16(3): 1056-65.
- Fleming, R. E., Whitman, I. P. et Gitlin, J. D. 1991. "Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia". *Am J Physiol* 260(2 Pt 1): L68-74.
- Floris, G., Medda, R., Padiglia, A. et Musci, G. 2000. "The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach". *Biochem Pharmacol* 60(12): 1735-41.
- Fox, P. L. 2003. "The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship". *Biometals* 16(1): 9-40.
- Fox, P. L., Mukhopadhyay, C. et Ehrenwald, E. 1995. "Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin". *Life Sci* 56(21): 1749-58.
- Frieden, E. 1980. "Caeruloplasmin: a multi-functional metalloprotein of vertebrate plasma". *Ciba Found Symp* 79: 93-124.
- Frieden, E. 1981. "Copper Proteins". *Dans Metal ions in biological system* vol 13, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA: 117-40.
- Frieden, E. 1986. "Perspectives on copper biochemistry". *Clin Physiol Biochem* 4(1): 11-9.
- Frieden, E. et Hsieh, H. S. 1976. "Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity". *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 44: 187-236.
- Galdston, M., Levytska, V., Schwartz, M. S. et Magnusson, B. 1984. "Ceruloplasmin. Increased serum concentration and impaired antioxidant activity in cigarette smokers, and ability to prevent suppression of elastase inhibitory capacity of alpha 1-proteinase inhibitor". *Am Rev Respir Dis* 129(2): 258-63.
- Gitlin, D. et Janeway, C. A. 1960. "Turnover of the copper and protein moieties of ceruloplasmin". *Nature* 185: 693.
- Gitlin, J. D. 1998. "Aceruloplasminemia". *Pediatr Res* 44(3): 271-6.
- Goldstein, I. M., Kaplan, H. B., Edelson, H. S. et Weissmann, G. 1979. "A new function for ceruloplasmin as an acute-phase reactant in inflammation: a scavenger of superoxide anion radicals". *Trans Assoc Am Physicians* 92: 360-9.
- Gressens, P. 2005. "Neuronal migration disorders". *J Child Neurol* 20(12): 969-71.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., Uzunov, D. et Costa, E. 2000. "Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study". *Arch Gen Psychiatry* 57(11): 1061-9.
- Gutteridge, J. M. 1983. "Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation". *FEBS Lett* 157(1): 37-40.
- Gutteridge, J. M. 1985. "Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities". *Chem Biol Interact* 56(1): 113-20.
- Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P. et Cremer, H. 2002. "Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis". *Nat Neurosci* 5(10): 939-45.
- Harris, Z. L., Durley, A. P., Man, T. K. et Gitlin, J. D. 1999. "Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(19): 10812-7.

- Harris, Z. L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., MacGillivray, R. T. et Gitlin, J. D. 1995. "Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism". *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7): 2539-43.
- Hilton, M., Spenser, D. C., Ross, P., Ramsey, A. et McArdle, H. J. 1995. "Characterisation of the copper uptake mechanism and isolation of the ceruloplasmin receptor/copper transporter in human placental vesicles". *Biochim Biophys Acta* 1245(2): 153-60.
- Holmberg, C. G. 1944. "On the presence of a laccase-like enzyme in serum and its relation to the copper in serum". *Acta Physiol Scand* 8: 227-29.
- Holmberg, C. G. et Laurell, C. B. 1948. "Investigations in serum copper II. Isolation of the copper containing protein, and description of its properties." *Acta Chem Scand* 2: 550-56.
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. A., Grant, P. E., Hourihane, J. O., Martin, N. D. et Walsh, C. A. 2000. "Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations". *Nat Genet* 26(1): 93-6.
- Jackson, G. E., Mkhonta-Gama, L., Voye, A. et Kelly, M. 2000. "Design of copper-based anti-inflammatory drugs". *J Inorg Biochem* 79(1-4): 147-52.
- Jaeger, J. L., Shimizu, N. et Gitlin, J. D. 1991. "Tissue-specific ceruloplasmin gene expression in the mammary gland". *Biochem J* 280 (Pt 3): 671-7.
- Jeannotte, R., Paquin, J., Petit-Turcotte, C. et Day, R. 1997. "Convertase PC2 and the neuroendocrine polypeptide 7B2 are co-induced and processed during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells". *DNA Cell Biol* 16(10): 1175-87.
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A. et Kalnins, V. I. 1982. "Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells". *J Cell Biol* 94(2): 253-62.
- Jossin, Y., Bar, I., Ignatova, N., Tissir, F., De Rouvroit, C. L. et Goffinet, A. M. 2003. "The reelin signaling pathway: some recent developments". *Cereb Cortex* 13(6): 627-33.
- Jossin, Y., Ignatova, N., Hiesberger, T., Herz, J., Lambert de Rouvroit, C. et Goffinet, A. M. 2004. "The central fragment of Reelin, generated by proteolytic processing in vivo, is critical to its function during cortical plate development". *J Neurosci* 24(2): 514-21.
- Juan, S. H. et Aust, S. D. 1998. "Studies on the interaction between ferritin and ceruloplasmin". *Arch Biochem Biophys* 355(1): 56-62.
- Kamolailp, M. 2005. "Menkes syndrome: a case report". *J Med Assoc Thai* 88 Suppl 3: S290-4.
- Kaplan, J. et O'Halloran, T. V. 1996. "Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again". *Science* 271(5255): 1510-2.
- Kataoka, M. et Tavassoli, M. 1984. "Ceruloplasmin receptors in liver cell suspensions are limited to the endothelium". *Exp Cell Res* 155(1): 232-40.
- Kataoka, M. et Tavassoli, M. 1985. "Identification of ceruloplasmin receptors on the surface of human blood monocytes, granulocytes, and lymphocytes". *Exp Hematol* 13(8): 806-10.
- Ke, Y., Ho, K., Du, J., Zhu, L., Xu, Y., Wang, Q., Wang, C. Y., Li, L., Ge, X., Chang, Y. et Qian, Z. M. 2006. "Role of soluble ceruloplasmin in iron uptake by midbrain and hippocampus neurons". *J Cell Biochem* 98(4): 912-9.
- Khrestchatsky, M., Jourquin, J., Ogier, C., Charton, G., Bernard, A., Tremblay, E. et Rivera, S. 2003. "[Matrix metalloproteinases and their inhibitors, modulators of neuro-immune interactions and of pathophysiological processes in the nervous system]". *J Soc Biol* 197(2): 133-44.
- Kim, H. M., Qu, T., Kriho, V., Lacor, P., Smalheiser, N., Pappas, G. D., Guidotti, A., Costa, E. et Sugaya, K. 2002. "Reelin function in neural stem cell biology". *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 4020-5.
- Klomp, L. W. et Gitlin, J. D. 1996. "Expression of the ceruloplasmin gene in the human retina and brain: implications for a pathogenic model in aceruloplasminemia". *Hum Mol Genet* 5(12): 1989-96.
- Kubis, N. et Catala, M. 2005. "[Where have the neuronal stem cells of the subependymal zone gone in human beings?]". *Morphologie* 89(284): 49-54.

- Kunapuli, S. P., Singh, H., Singh, P. et Kumar, A. 1987. "Ceruloplasmin gene expression in human cancer cells". *Life Sci* 40(23): 2225-8.
- Lacor, P. N., Grayson, D. R., Auta, J., Sugaya, I., Costa, E. et Guidotti, A. 2000. "Reelin secretion from glutamatergic neurons in culture is independent from neurotransmitter regulation". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3556-61.
- Lambert de Rouvroit, C. et Goffinet, A. M. 2001. "Neuronal migration". *Mech Dev* 105(1-2): 47-56.
- Linder, M. C., Bryant, R. R., Lim, S., Scott, L. E. et Moor, J. E. 1979. "Ceruloplasmin elevation and synthesis in rats with transplantable tumors". *Enzyme* 24(2): 85-95.
- Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. et Lomeli, N. 1998. "Copper transport". *Am J Clin Nutr* 67(5 Suppl): 965S-971S.
- Lindley, P. F., Card, G., Zaitzeva, I., Zatischev, V., Reinhammar, B., Selin-lindgren, E. et Yoshida, K. 1997. "An X-ray structural study of human ceruloplasmin in relation to ferroxidase activity". *J Biol Inorg Chem* 2: 454-63.
- Lockhart, P. J. et Mercer, J. F. 1999. "Cloning and expression analysis of the sheep ceruloplasmin cDNA". *Gene* 236(2): 251-7.
- Louro, M. O., Cocho, J. A., Mera, A. et Tutor, J. C. 2000. "Immunochemical and enzymatic study of ceruloplasmin in rheumatoid arthritis". *J Trace Elem Med Biol* 14(3): 174-8.
- Lovstad, R. A. 1981. "The protective action of ceruloplasmin on Fe²⁺ stimulated lysis of rat erythrocytes". *Int J Biochem* 13(2): 221-4.
- Lowndes, S. A. et Harris, A. L. 2004. "Copper chelation as an antiangiogenic therapy". *Oncol Res* 14(11-12): 529-39.
- Machonkin, T. E., Zhang, H. H., Hedman, B., Hodgson, K. O. et Solomon, E. I. 1998. "Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced Type 1 copper site". *Biochemistry* 37(26): 9570-8.
- Mackiewicz, A., Ganapathi, M. K., Schultz, D. et Kushner, I. 1987. "Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins". *J Exp Med* 166(1): 253-8.
- MacPherson, P. A., Jones, S., Pawson, P. A., Marshall, K. C. et McBurney, M. W. 1997. "P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro". *Neuroscience* 80(2): 487-99.
- MacPherson, P. A. et Mc Burney, M. W. 1995. "P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation". *Dans Methods: a companion to methods in Enzymology* 7: 487-99.
- Magnuson, D. S., Morassutti, D. J., Staines, W. A., McBurney, M. W. et Marshall, K. C. 1995. "In vivo electrophysiological maturation of neurons derived from a multipotent precursor (embryonal carcinoma) cell line". *Brain Res Dev Brain Res* 84(1): 130-41.
- Maltais, D., Desroches, D., Aouffen, M., Mateescu, M. A., Wang, R. et Paquin, J. 2003. "The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization". *Neuroscience* 121(1): 73-82.
- Mani, K., Cheng, F., Havsmark, B., David, S. et Fransson, L. A. 2004. "Involvement of glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin in the copper/zinc-nitric oxide-dependent degradation of glypican-1 heparan sulfate in rat C6 glioma cells". *J Biol Chem* 279(13): 12918-23.
- Mann, T. et Keilin, D. 1938. "Haemocuprein and hepatocuprein, copper protein compounds of blood and liver in mammals". *Proc Roy Soc London B* 126: 303-15.
- Marklund, S. L. 1986. "Ceruloplasmin, extracellular-superoxide dismutase, and scavenging of superoxide anion radicals". *J Free Radic Biol Med* 2(4): 255-60.
- Mateescu, M. A., Chahine, R., Roger, S., Atanasiu, R., Yamaguchi, N., Lalumiere, G. et Nadeau, R. 1995. "Protection of myocardial tissue against deleterious effects of oxygen free radicals by ceruloplasmin". *Arzneimittelforschung* 45(4): 476-80.
- Maurin, J. C., Couble, M. L., Didier-Bazes, M., Brisson, C., Magloire, H. et Bleicher, F. 2004. "Expression and localization of reelin in human odontoblasts". *Matrix Biol* 23(5): 277-85.

- Mazumder, B. et Fox, P. L. 1999. "Delayed translational silencing of ceruloplasmin transcript in gamma interferon-activated U937 monocytic cells: role of the 3' untranslated region". *Mol Cell Biol* 19(10): 6898-905.
- Mazumder, B., Mukhopadhyay, C. K., Prok, A., Cathcart, M. K. et Fox, P. L. 1997. "Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells". *J Immunol* 159(4): 1938-44.
- McAuslan, B. R. et Reilly, W. 1980. "Endothelial cell phagokinesis in response to specific metal ions". *Exp Cell Res* 130(1): 147-57.
- McAuslan, B. R., Reilly, W. G., Hannan, G. N. et Gole, G. A. 1983. "Angiogenic factors and their assay: activity of formyl methionyl leucyl phenylalanine, adenosine diphosphate, heparin, copper, and bovine endothelium stimulating factor". *Microvasc Res* 26(3): 323-38.
- McBurney, M. W. 1993. "P19 embryonal carcinoma cells". *Int J Dev Biol* 37(1): 135-40.
- McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M. K. et Anderson, P. J. 1982. "Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line". *Nature* 299(5879): 165-7.
- McBurney, M. W., Reuhl, K. R., Ally, A. I., Nasipuri, S., Bell, J. C. et Craig, J. 1988. "Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture". *J Neurosci* 8(3): 1063-73.
- Meyer, L. A., Durley, A. P., Prohaska, J. R. et Harris, Z. L. 2001. "Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice". *J Biol Chem* 276(39): 36857-61.
- Miyajima, H., Nishimura, Y., Mizoguchi, K., Sakamoto, M., Shimizu, T. et Honda, N. 1987. "Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration". *Neurology* 37(5): 761-7.
- Mollgard, K., Dziegielewska, K. M., Saunders, N. R., Zakut, H. et Soreq, H. 1988. "Synthesis and localization of plasma proteins in the developing human brain. Integrity of the fetal blood-brain barrier to endogenous proteins of hepatic origin". *Dev Biol* 128(1): 207-21.
- Morassutti, D. J., Staines, W. A., Magnuson, D. S., Marshall, K. C. et McBurney, M. W. 1994. "Murine embryonal carcinoma-derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum". *Neuroscience* 58(4): 753-63.
- Morell, A. G., Irvine, R. A., Sternlieb, I., Scheinberg, I. H. et Ashwell, G. 1968. "Physical and chemical studies on ceruloplasmin. V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo". *J Biol Chem* 243(1): 155-9.
- Mukhopadhyay, C. K., Attieh, Z. K. et Fox, P. L. 1998. "Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake". *Science* 279(5351): 714-7.
- Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B. et Fox, P. L. 2000. "Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency". *J Biol Chem* 275(28): 21048-54.
- Mukhopadhyay, C. K., Mazumder, B., Lindley, P. F. et Fox, P. L. 1997. "Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces". *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21): 11546-51.
- Musci, G., Bonaccorsi di Patti, M. C., Petruzzelli, R., Giartosio, A. et Calabrese, L. 1996. "Divalent cation binding to ceruloplasmin". *Biometals* 9(1): 66-72.
- Nadarajah, B. et Parnavelas, J. G. 2002. "Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex". *Nat Rev Neurosci* 3(6): 423-32.
- Nasulewicz, A., Mazur, A. et Opolski, A. 2004. "Role of copper in tumour angiogenesis--clinical implications". *J Trace Elem Med Biol* 18(1): 1-8.
- Olivares, M. et Uauy, R. 1996. "Copper as an essential nutrient". *Am J Clin Nutr* 63(5): 791S-6S.
- Omoto, E. et Tavassoli, M. 1990. "Purification and partial characterization of ceruloplasmin receptors from rat liver endothelium". *Arch Biochem Biophys* 282(1): 34-8.
- Orena, S. J., Goode, C. A. et Linder, M. C. 1986. "Binding and uptake of copper from ceruloplasmin". *Biochem Biophys Res Commun* 139(2): 822-9.

- Ortel, T. L., Takahashi, N. et Putnam, F. W. 1983. "Separation of limited tryptic fragments of human ceruloplasmin by gel-permeation high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr* 266: 257-63.
- Osaki, S., Johnson, D. A. et Frieden, E. 1966. "The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum". *J Biol Chem* 241(12): 2746-51.
- Osaki, S., Johnson, D. A. et Frieden, E. 1971. "The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I". *J Biol Chem* 246(9): 3018-23.
- Panteri, R., Paiardini, A. et Keller, F. 2006. "A 3D model of Reelin subrepeat regions predicts Reelin binding to carbohydrates". *Brain Res* 1116(1): 222-30.
- Paquin, J., Danalache, B. A., Jankowski, M., McCann, S. M. et Gutkowska, J. 2002. "Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes". *Proc Natl Acad Sci USA* 99(14): 9550-5.
- Parnas, D. et Linial, M. 1995. "Cholinergic properties of neurons differentiated from an embryonal carcinoma cell-line (P19)". *Int J Dev Neurosci* 13(7): 767-81.
- Parnas, D. et Linial, M. 1997. "Acceleration of neuronal maturation of P19 cells by increasing culture density". *Brain Res Dev Brain Res* 101(1-2): 115-24.
- Parnas, D. et Linial, M. 1997. "Culture density regulates both the cholinergic phenotype and the expression of the CNTF receptor in P19 neurons". *J Mol Neurosci* 8(2): 115-30.
- Patel, B. N. et David, S. 1997. "A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes". *J Biol Chem* 272(32): 20185-90.
- Patel, B. N., Dunn, R. J. et David, S. 2000. "Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain". *J Biol Chem* 275(6): 4305-10.
- Percival, S. S. et Harris, E. D. 1991. "Regulation of Cu,Zn superoxide dismutase with copper. Ceruloplasmin maintains levels of functional enzyme activity during differentiation of K562 cells". *Biochem J* 274 (Pt 1): 153-8.
- Platonova, N. A., Zhiguleva, E. A., Tsymbalenko, N. V., Mishchenko, B. S., Vasin, A. V., Zhivul'ko, T. V. et Puchkova, L. V. 2004. "[Age-related features of ceruloplasmin biosynthesis and distribution in rats]". *Ontogenez* 35(3): 171-82.
- Puchkova, L. V., Sasina, L. K., Aleinikova, T. D., Zakharova, E. T. et Gaitskhoki, V. S. 1997. "Reconstitution of the intercellular transfer pathway of the peptide moiety of ceruloplasmin in mammals". *Biochemistry (Mosc)* 62(7): 697-703.
- Puchkova, L. V., Verbina, I. A., Denezhkina, V. V., Shavlovskii, M. M., Gaitskoki, V. S. et Neifakh, S. A. 1990. "[Various properties of the ceruloplasmin receptor, isolated from human erythrocyte membranes]". *Biokhimiia* 55(12): 2182-9.
- Qian, Z. M. et Ke, Y. 2001. "Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism". *Brain Res Brain Res Rev* 35(3): 287-94.
- Raju, K. S., Alessandri, G., Ziche, M. et Gullino, P. M. 1982. "Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis". *J Natl Cancer Inst* 69(5): 1183-8.
- Rakic, P. 2006. "A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering". *Cereb Cortex* 16 Suppl 1: i3-17.
- Reynolds, J. N., Prasad, A., Gillespie, L. L. et Paterno, G. D. 1996. "Developmental expression of functional GABAA receptors containing the gamma 2 subunit in neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells". *Brain Res Mol Brain Res* 35(1-2): 11-8.
- Reynolds, J. N., Ryan, P. J., Prasad, A. et Paterno, G. D. 1994. "Neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells express multiple GABAA receptor subunits and fully functional GABAA receptors". *Neurosci Lett* 165(1-2): 129-32.
- Richardson, D. R. 1999. "Role of ceruloplasmin and ascorbate in cellular iron release". *J Lab Clin Med* 134(5): 454-65.
- Rivera, S., Jourquin, J., Ogier, C., Bernard, A., Charton, G., Tremblay, E. et Khrestchatisky, M. 2004. "[The MMP/TIMP system in the nervous system]". *Med Sci (Paris)* 20(1): 55-60.

- Roeser, H. P., Lee, G. R., Nacht, S. et Cartwright, G. E. 1970. "The role of ceruloplasmin in iron metabolism". *J Clin Invest* 49(12): 2408-17.
- Rudnicki, M. A. et Mc Burney, M. W. 1987. "Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines". *Dans Teratocarcinomas and embryonic Stem cells: A practical approach* (E.J. Robertson). Oxford, IRL Press: 19-49.
- Ryden, L. 1971. "Evidence for proteolytic fragments in commercial samples of human ceruloplasmin". *FEBS Lett* 18(2): 321-325.
- Ryden, L. et Bjork, I. 1976. "Reinvestigation of some physicochemical and chemical properties of human ceruloplasmin (ferroxidase)". *Biochemistry* 15(16): 3411-7.
- Saenko, E. L., Basevich, V. V. et Iaropolov, A. I. 1988. "[Characteristics of ceruloplasmin interaction with a specific receptor of human erythrocytes]". *Biokhimiia* 53(2): 317-21.
- Saenko, E. L., Skorobogat'ko, O. V. et Yaropolov, A. I. 1990. "Protective action of blood ceruloplasmin obtained from normal individuals on red blood cells compared with that from patients with Wilson's disease". *Biomed Sci* 1(5): 453-9.
- Salzer, J. L., Lovejoy, L., Linder, M. C. et Rosen, C. 1998. "Ran-2, a glial lineage marker, is a GPI-anchored form of ceruloplasmin". *J Neurosci Res* 54(2): 147-57.
- Sasina, L. K., Puchkova, L. V. et Gaitskhoki, V. S. 1998. "Study of intracellular localization and traffic of newly synthesized ceruloplasmin receptor in cultured human fibroblasts". *Biochemistry (Mosc)* 63(10): 1172-7.
- Sasina, L. K., Tsybalenko, N. V., Platonova, N. A., Puchkova, L. V., Voronina, O. V., Gyulikhandanova, N. E. et Gaitskhoki, V. S. 2000. "Isolation and partial characterization of cDNA clone of human ceruloplasmin receptor". *Bull Exp Biol Med* 129(5): 491-5.
- Scheinberg, I. H. et Gitlin, D. 1952. "Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease)". *Science* 116(3018): 484-5.
- Scotti, A. L. et Herrmann, G. 2002. "Reelin immunoreactivity in dissociated cultures of the postnatal hippocampus". *Brain Res* 924(2): 209-18.
- Seeds, N. W., Basham, M. E. et Haffke, S. P. 1999. "Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene". *Proc Natl Acad Sci USA* 96(24): 14118-23.
- Seo, J. K. 2006. "[Wilson disease: an update.]". *Korean J Hepatol* 12(3): 333-63.
- Shepherd, G. M. 1994. "Neurobiology". Oxford University Press, Inc. New York, NY, USA: 192-225.
- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D. et Dancis, A. 1996. "A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast". *Science* 271(5255): 1552-7.
- Stern, R. V. et Frieden, E. 1990. "Detection of rat ceruloplasmin receptors using fluorescence microscopy and microdensitometry". *Anal Biochem* 190(1): 48-56.
- Stern, R. V. et Frieden, E. 1993. "Partial purification of the rat erythrocyte ceruloplasmin receptor monitored by an electrophoresis mobility shift assay". *Anal Biochem* 212(1): 221-8.
- Stevens, M. D., DiSilvestro, R. A. et Harris, E. D. 1984. "Specific receptor for ceruloplasmin in membrane fragments from aortic and heart tissues". *Biochemistry* 23(2): 261-6.
- Stocks, J., Gutteridge, J. M., Sharp, R. J. et Dormandy, T. L. 1974. "The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol". *Clin Sci Mol Med* 47(3): 223-33.
- Sunderman, F. W., Jr. et Nomoto, S. 1970. "Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity". *Clin Chem* 16(11): 903-10.
- Takahashi, N., Ortel, T. L. et Putnam, F. W. 1984. "Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule". *Proc Natl Acad Sci USA* 81(2): 390-4.
- Tardioli, P. W., Pedroche, J., Giordano, R. L., Fernandez-Lafuente, R. et Guisan, J. M. 2003. "Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose". *Biotechnol Prog* 19(2): 352-60.
- Tavassoli, M., Kishimoto, T. et Kataoka, M. 1986. "Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin". *J Cell Biol* 102(4): 1298-303.

- Tsirka, S. E. 2002. "Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function". *Biochem Soc Trans* 30(2): 222-5.
- Ulrich, H. et Majumder, P. 2006. "Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications". *Cell Prolif* 39(4): 281-300.
- Ungar-Waron, H., Gluckman, A., Spira, E., Waron, M. et Trainin, Z. 1978. "Ceruloplasmin as a marker of neoplastic activity in rabbits bearing the VX-2 carcinoma". *Cancer Res* 38(5): 1296-9.
- Vachette, P., Dainese, E., Vasyliov, V. B., Di Muro, P., Beltramini, M., Svergun, D. I., De Filippis, V. et Salvato, B. 2002. "A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin". *J Biol Chem* 277(43): 40823-31.
- van der Heyden, M. A. et Defize, L. H. 2003. "Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation". *Cardiovasc Res* 58(2): 292-302.
- Van Eden, M. E. et Aust, S. D. 2000. "Intact human ceruloplasmin is required for the incorporation of iron into human ferritin". *Arch Biochem Biophys* 381(1): 119-26.
- Vassiliev, V., Harris, Z. L. et Zatta, P. 2005. "Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases". *Brain Res Brain Res Rev* 49(3): 633-40.
- Waggoner, D. J., Bartnikas, T. B. et Gitlin, J. D. 1999. "The role of copper in neurodegenerative disease". *Neurobiol Dis* 6(4): 221-30.
- Wang, R., Zhang, L., Mateescu, M. A. et Nadeau, R. 1995. "Ceruloplasmin: an endogenous depolarizing factor in neurons?" *Biochem Biophys Res Commun* 207(2): 599-605.
- Wilson, L. et Maden, M. 2005. "The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube". *Dev Biol* 282(1): 1-13.
- Wolf, T. L., Kotun, J. et Meador-Woodruff, J. H. 2006. "Plasma copper, iron, ceruloplasmin and ferroxidase activity in schizophrenia". *Schizophr Res* 86(1-3): 167-71.
- Xu, X., Pin, S., Gathinji, M., Fuchs, R. et Harris, Z. L. 2004. "Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis". *Ann N Y Acad Sci* 1012: 299-305.
- Yamashoji, S. et Kajimoto, G. 1983. "Antioxidant effect of caeruloplasmin on microsomal lipid peroxidation". *FEBS Lett* 152(2): 168-70.
- Zaitsev, V. N., Zaitseva, I., Papiz, M. et Lindley, P. F. 1999. "An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma". *J Biol Inorg Chem* 4(5): 579-87.
- Zaitseva, I., Zaitsev, V. N., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A. et Lindley, P. F. 1996. "The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centers". *J Natl Cancer Inst* 69: 475-82.
- Zhao, S., Chai, X., Forster, E. et Frotscher, M. 2004. "Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells". *Development* 131(20): 5117-25.